

US03/35068

233

G
M

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁵ : C12N 15/11, C12Q 1/68 // C07H 21/00	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 94/23026 (43) Date de publication internationale: 13 octobre 1994 (13.10.94)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR94/00336 (22) Date de dépôt international: 25 mars 1994 (25.03.94) (30) Données relatives à la priorité: 93 03514 26 mars 1993 (26.03.93) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): GENSET [FR/FR]; 1, passage Étienne-Delaunay, F-75011 Paris (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): VASSEUR, Marc [FR/FR]; 25, boulevard Arago, F-75013 Paris (FR). BLUMENFELD, Marta [FR/FR]; 75, rue Bobillot, F-75013 Paris (FR). MEGUENNI, Saïd [FR/FR]; 2, avenue du Maréchal-Dode, F-95600 Eaubonne (FR). PODDEVIN, Bruno [FR/FR]; 9, rue Gerbert, F-75015 Paris (FR). (74) Mandataire: WARCOIN, Jacques; Cabinet Regimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).		(81) Etats désignés: AU, CA, JP, KR, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publiée Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.
(54) Title: STAPLE AND SEMI-STAPLE OLIGONUCLEOTIDES, METHOD OF PREPARATION AND APPLICATIONS		
(54) Titre: OLIGONUCLEOTIDES AGRAFES ET SEMI-AGRAFES, PROCEDE DE PREPARATION ET APPLICATIONS		
(57) Abstract		
<p>Staple and semi-staple oligonucleotides useful as anti-sense molecules in cosmetics, diagnosis and especially pharmacology, and methods of preparation of such molecules. The staple and semi-staple oligonucleotides of the present invention are oligonucleotide type molecules, the 3' terminal or the two 3' and 5' terminals being engaged in intramolecular hydrogen bindings between pairs of complementary bases. As a result, these molecules are better able to withstand exonuclease attacks and act with greater durability as an anti-sense factor than the corresponding nuclear oligonucleotides.</p>		
(57) Abrégé <p>La présente invention concerne des oligonucléotides agrafes ou semi-agrafes utiles, notamment, à des fins pharmacologiques, comme molécules anti-sens ou à des fins cosmétologiques ou diagnostiques, ainsi que les méthodes d'obtention de telles molécules. Les oligonucléotides agrafes et semi-agrafes objets de la présente invention sont des molécules de nature oligonucléotidique dont l'extrémité 3' ou les deux extrémités 3' et 5' sont engagées dans des liaisons hydrogènes intra-moléculaires entre paires de bases complémentaires. Ces molécules présentent, par suite, une résistance accrue aux attaques exonucléasiques et peuvent agir comme facteur anti-sens avec une plus grande pérennité que les oligonucléotides nucléaires correspondants.</p>		

BEST AVAILABLE COPY

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Brésil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Biélorus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République Centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	République slovaque
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

OLIGONUCLEOTIDES AGRAFES ET SEMI-AGRAFES, PROCEDE DE PREPARATION ET APPLICATIONS.

La présente invention concerne un nouveau type d'oligonucléotides. Les oligonucléotides selon l'invention sont de courtes
5 molécules synthétiques d'ADN, d'ARN ou mixtes. En particulier les oligonucléotides dits "antisens" ont une séquence complémentaire à une séquence cible appartenant à un gène ou à un ARN messenger dont on désire bloquer spécifiquement l'expression. Les oligonucléotides antisens peuvent être dirigés contre une séquence d'ARN messenger, ou bien contre
10 une séquence d'ADN. Les oligonucléotides antisens hybrident à la séquence dont ils sont complémentaires et peuvent ainsi bloquer l'expression de l'ARN messenger portant cette séquence.

Le terme "oligonucléotide" est ici utilisé de façon générale pour désigner un polynucléotide de 2 à 100, et plus généralement de 5 à 50,
15 nucléotides en série ribo-, désoxyribo- ou mixte. Lorsqu'il sera question qu'une propriété particulière liée à l'utilisation d'une série désoxyribo- ou d'une série ribo-, on utilisera la dénomination complète oligodésoxyribonucléotide ou oligoribonucléotide. Le terme "appariement" ou "hybridation" utilisé ici signifie la formation de liaisons hydrogènes
20 entre des paires de bases complémentaires, telles que la guanine et la cytosine formant trois liens hydrogènes entre elles, et l'adénine et la thymine ou l'uracile en formant deux.

I. ETAT DE LA TECHNIQUE

I. 1. Les oligonucléotides antisens modifiés

25 Les oligonucléotides antisens sont synthétisés par voie chimique et comportent fréquemment des modifications altérant le squelette même de la molécule ou portent des groupement réactifs additionnels, localisés à leurs extrémités. Ces modifications introduites dans les oligonucléotides antisens ont pour buts soit d'augmenter la résistance de ces molécules à la
30 dégradation nucléolytique, soit de favoriser leurs interactions avec leurs cibles, soit de permettre des réactions de dégradation/modification spécifiques des cibles, ARN ou ADN, soit d'accroître leur pénétration intra-cellulaire.

Les oligonucléotides antisens sont sensibles aux dégradations
35 nucléasiques, et principalement à l'action des exonucléases. Les nucléases se trouvent dans tous les compartiments -cellulaires et extra-cellulaires, en particulier dans le sérum- et provoquent une dégradation rapide de ces

molécules. Une utilisation pharmacologique de molécules antisens implique la résolution de ces problèmes de dégradation afin d'arriver à une pharmacocinétique satisfaisante et donc à une pérennisation suffisante des effets de ces molécules. De nombreuses modifications
5 chimiques permettent aux oligonucléotides antisens de devenir résistants aux nucléases.

Certaines modifications affectent directement la structure ou la nature de la liaison phosphodiester (méthylphosphonates, phosphorothioates, oligonucléotides alpha, phosphoramidates, pour citer
10 quelques exemples), d'autres consistent en l'addition de groupements de blocage aux extrémités 3' et 5' des molécules (Perbost et al., 1989; Bertrand et al., 1989; Bazile et al., 1989; Andrus et al., 1989; Cazenave et al., 1989; Zon, 1988; Maher and Dolnick, 1988; Gagnor et al., 1987; Markus-Sekura, 1987).

1. 2 . Ciblage des oligonucléotides antisens anti-ARN messenger

15 Toutes les régions d'un ARN messenger ne sont pas sensibles de la même façon aux effets d'un oligonucléotide antisens. Un ARN messenger n'est pas une molécule linéaire figée, mais au contraire une molécule comportant de nombreuses structurations secondaires (hybridations intra-moléculaires complexes), tertiaires (repliements et conformations
20 particulières, pseudo-noeuds), et interagissant avec des nucléoprotéines structurales et fonctionnelles (protéines basiques, complexes d'épissage, de poly-adénylation, de capping, complexe de traduction par exemple). La disponibilité effective et l'accessibilité des différentes régions d'un ARN messenger va dépendre de leurs engagements dans ces structurations.

25 Corrélativement, l'efficacité d'un agent inhibiteur interagissant avec telle ou telle séquence va dépendre également de l'engagement de cette séquences dans une fonction particulière. Les régions cibles pour les molécules antisens doivent être accessibles à l'oligonucléotide.

L'utilisation de logiciels de prédiction de structures secondaires
30 permet de prévoir des degrés d'accessibilité théoriques et donc d'orienter le choix de cibles pour des oligonucléotide antisens. Globalement, les régions les plus utilisées comme cibles sont les sites de démarrage de la traduction (région de l'AUG initiateur) ainsi que les sites d'épissage (jonctions SD/SA). De nombreuses autres séquences n'ayant pas de
35 fonctionnalités particulières et non engagées dans des appariement intra-moléculaires se sont avérées également efficaces comme cible pour des oligonucléotides antisens (voir les exemples cités plus loin).

1.3. Oligonucléotides antisens dirigés contre l'ADN

Les oligodésoxyribonucléotides antisens peuvent également être dirigés contre certaines régions d'ADN bicaténaire (séquences homopurines/homopyrimidines ou riches en purines/pyrimidines) et former ainsi des triples hélices (Perroualt et al., 1990; François et al.(A), 1989; François et al.(B), 1989; François et al.(C), 1989; Wang et al., 1989; Maher et al., 1989; Sun et al., 1989; Boidot-Forget et al., 1988; Moser and Dervan, 1987; Dervan, 1986). Des oligonucléotides dirigées ainsi contre l'ADN ont été appelés "anti-gène" ou encore "anti-code". La formation d'une triple hélice, au niveau d'une séquence particulière, peut bloquer la fixation de protéines intervenant dans l'expression d'un gène et/ou permettre d'introduire des dommages irréversibles dans l'ADN si l'oligonucléotide considéré possède un groupement réactif particulier. De tels oligonucléotides antisens peuvent devenir de véritables endonucléases de restriction artificielles, dirigées à la demande contre des séquences spécifiques.

1.4. Mode d'action des oligonucléotides antisens

L'hybridation entre un oligonucléotide antisens et un ARN messager cible peut en bloquer l'expression de plusieurs manières, soit de façon stérique, soit de façon pseudo-catalytique (Gagnor et al., 1989; Jessus et al., 1988; Markus-Sekura, 1987):

-l'interaction entre l'ARN messager et un oligonucléotide antisens complémentaire peut créer une barrière physique interdisant la fixation et/ou la progression de protéines ou de complexes protéiques nécessaire à la traduction, à la maturation, à la stabilisation ou au transport de l'ARN messager. Ce blocage physique aboutira finalement à une inhibition de l'expression de l'ARN messager ciblé.

-l'hybridation entre un ARN messager et un oligodésoxyribonucléotide antisens va créer un substrat pour la RNase H, enzyme présent dans toutes les cellules eucaryotes. La RNase H est un enzyme qui dégrade spécifiquement l'ARN lorsqu'il est hybridé à de l'ADN. L'hybridation d'un oligonucléotide antisens ADN à un ARN cible aboutira donc à la coupure de cet ARN cible à l'emplacement de cette hybridation, et donc à son inactivation définitive.

-Par ailleurs, comme indiqué plus haut, les oligonucléotides antisens peuvent comporter des groupement réactifs capables de produire directement des dommages irréversibles dans la molécules d'ARN cible.

En ce qui concerne les oligonucléotides antisens dirigés contre l'ADN ils peuvent agir soit en inhibant la fixation d'une protéine de régulation indispensable à l'expression du gène ciblé (facteur de transcription par exemple), soit en introduisant des dommages irréversibles (coupures, cross-links) dans la molécule d'ADN, la rendant inapte, localement, pour l'expression génétique.

1.5. Exemples d'application des oligonucléotides antisens

Les oligonucléotides antisens permettent de bloquer spécifiquement l'expression d'ARN messagers cellulaires, par exemple de messagers de type oncogénique, (Tortora et al., 1990; Chang et al., 1989; Anfossi et al., 1989; Zheng et al., 1989; Shuttleworth et al., 1988; Cope and Wille, 1989; Cazenave et al., 1989) et de nombreux différents types d'ARN messenger viraux, provenant de virus aussi variés que le VSV (Degols et al., 1989; Leonetti et al., 1989), le SV40 (Westermann, et al., 1989), les virus influenza (Kabanov et al., 1990; Zerial et al., 1987), le virus de l'encéphalomyocardite (Sankar et al., 1989), l'adénovirus (Miroshnichenko et al., 1989), le HSV (Gao et al., 1988) et le HIV (Matsukura et al., 1989; Stevenson et al., 1989; Matsukura et al., 1988; Goodchild et al., 1988).

II. RÉSUMÉ DE L'INVENTION

II.1. Problèmes soulevés par les applications pharmacologiques des antisens

Les oligonucléotides antisens sont donc des agents pharmacologiques potentiels, puissants et hautement spécifiques, permettant d'inhiber l'expression de messagers codant pour des produits exerçant des effets pathogènes.

L'utilisation thérapeutique des oligonucléotides se heurte cependant à plusieurs problèmes de type physiologiques, en particulier celui de la délivrance intracellulaire de ces molécules et celui de leur sensibilité à la dégradation nucléolytique. Certaines modifications chimiques des oligonucléotides permettent de surmonter le problème de la sensibilité aux nucléases mais au prix d'un nouveau problème, celui de la toxicité éventuelle des modifications chimiques introduites dans la molécule.

L'utilisation des oligonucléotides antisens modifiés pose en effet des problèmes de nature toxicologiques. Si certaines des modifications sont réputées plutôt neutres, la plupart ne sont pas dénuées de toxicité potentielle.

Des oligonucléotides antisens modifiés chimiquement peuvent présenter une toxicité à plusieurs niveaux, soit directement par des effets de la molécule entière, soit indirectement via les effets des produits de dégradation. Des nucléotides porteurs de modifications chimiques, et
5 présents dans une cellule à une concentration élevée peuvent ainsi présenter une toxicité -et plus particulièrement une génotoxicité- non négligeable au plan pharmacologique.

Par exemple, de nombreux problèmes soulevés par l'emploi d'oligonucléotides antisens modifiés, en particulier des effets anti-viraux
10 non séquence-spécifiques, semblent bien être dus à la nature de certaines des modifications chimiques introduites dans les oligonucléotides antisens pour les rendre résistants aux nucléases.

Au plan toxicologique, il est donc évident que moins on modifie la structure naturelle de l'oligonucléotide, moins on risque d'être confronté
15 à des problèmes pharmacologiques. Une molécule naturelle d'ADN ou d'ARN, ainsi que ses produits de dégradation, ne pose pas ou peu de problème de toxicologie et de pharmacocinétique, ce qui n'est pas le cas d'une structure modifiée pouvant donner après métabolisation des dérivés multiples et potentiellement toxiques.

20 Les oligonucléotides antisens peuvent également dans certains cas présenter une toxicité spécifique liée à la séquence ciblée. En effet l'oligonucléotide peut s'apparier à des séquences possédant un certain degré d'homologie avec la séquence cible induisant de ce fait un effet antisens indésiré et toxique.

25 II . 2 . *Sensibilité nucléolytique des oligonucléotides antisens.*

Dans les cellules, et plus encore dans un organisme, dans la circulation sanguine par exemple, les oligonucléotides antisens naturels sont sensibles aux nucléases.

Les nucléases sont des enzymes de dégradation capables de couper
30 les liaisons phosphodiester de l'ADN ou de l'ARN, soit en introduisant des coupures internes sur des molécules mono- ou bicaténares, soit en attaquant ces molécules à partir de leurs extrémités. Les enzymes attaquant de façon interne sont appelées les endonucléases et celles attaquant par les extrémités sont appelés exonucléases.

35 La stabilité des oligonucléotides antisens -donc leur efficacité- peut être considérablement augmentée en introduisant diverses modifications chimiques les rendant résistants à la dégradation comme décrit ci-dessus.

Il est établi que ce sont les exonucléases qui sont la principale cause de dégradation des oligonucléotides antisens dans le sérum et dans la cellule.

Plus particulièrement, il semble que les exonucléases s'attaquant à l'extrémité 3'OH soient surtout à incriminer dans ce phénomène.

5 Des modifications apportées à la structure des extrémités des oligonucléotides antisens peuvent les protéger, bloquer les activités des exonucléases, et conférer aux oligonucléotides une stabilisation accrue.

Les contraintes thermodynamiques régissant la structure des acides nucléiques sont plus faibles dans une molécule d'ARN que dans une
10 molécule d'ADN. Ainsi, contrairement aux molécules d'ADN, les molécules d'ARN adoptent généralement spontanément des structures secondaires médiées par des appariements intramoléculaires. La structure secondaire des molécules d'ARN résulte directement de la séquence de ces molécules. Ainsi, dans le cas de molécules d'ARN antisens naturels, la séquence de la
15 cible peut permettre l'apparition spontanée d'une structure secondaire de la molécule complémentaire, pouvant dans certains cas augmenter sa résistance à la dégradation nucléolytique. Compte tenu de contraintes thermodynamiques plus fortes, les courts fragments d'ADN synthétiques utilisés comme agent antisens, plus rigides, n'adoptent que plus rarement
20 des structures secondaires, et la stabilité des structures adoptées est généralement plus faible. Ainsi, pour de nombreuses séquences cibles, l'apparition d'une structure secondaire incluant l'appariement intramoléculaire de l'extrémité 3' dans la molécule complémentaire est improbable.

25 Le but de la présente invention est de fournir des oligonucléotides antisens, notamment ne comportant que des désoxyribonucléotides normaux reliés entre eux par une liaison phosphodiester naturelle, mais présentant cependant une résistance à la dégradation, sans introduire de modifications chimiques susceptibles d'induire une toxicité, pouvant
30 comporter toute séquence anti-sens d'intérêt.

II. 3. *Oligonucléotides agrafes et semi-agrafes*

Pour ce faire la présente invention fournit une molécule d'oligonucléotide présentant au moins une extrémité 3' auto-appariée, appelée oligonucléotide semi-agrafe ou agrafe dans le cas où l'extrémité 5'
35 de cette molécule est également auto-appariée.

Plus précisément, la présente invention a pour objet des oligonucléotides anti-sens semi-agrafes ou agraphes constitués d'une séquence oligonucléotidique dont l'extrémité 3' ou les deux extrémités 3' et 5' sont engagées dans un auto-appariement intracaténaire impliquant l'hybridation d'au moins les deux bases terminales de l'extrémité 3' ou respectivement de chaque extrémité 3' et 5', avec un même nombre de bases consécutives complémentaires situées sur le brin, de manière à former une boucle à l'extrémité 3' ou respectivement une boucle à chaque extrémité encadrant une séquence centrale. Selon l'invention, d'une part, ladite séquence centrale comprend toute la séquence d'intérêt complémentaire d'une séquence cible appartenant à l'ADN ou l'ARNmessenger dont on désire bloquer l'expression et, d'autre part, lesdites boucles ont une séquence telle qu'elles ne s'hybrident pas avec le brin de la séquence cible.

Les oligonucléotides selon la présente invention, dont les extrémités 3' et/ou 5' engagées dans des liaisons d'hybridations intramoléculaires qui réservent un accès réduit aux exonucléases respectivement 3' et/ou 5' et par suite une sensibilité réduite et une protection partielle de ces oligonucléotides aux activités nucléolytiques de ces enzymes. Les oligonucléotides présentant le type de structure secondaire selon la présente invention sont par suite stabilisés dans les milieux contenant ce type d'activités enzymatiques comme le sérum ou le milieu intracellulaire.

Selon la présente invention, ladite séquence anti-sens d'intérêt ne se chevauche pas avec ladite séquence auto-appariée car ladite séquence anti-sens d'intérêt est entièrement comprise dans ladite séquence centrale. Cette caractéristique est particulièrement avantageuse car la stabilité et la longueur de la structure auto-appariée sont contrôlées indépendamment de la séquence anti-sens, et donc de la cible. Ces deux paramètres reposent uniquement sur les caractéristiques d'un fragment à structure en agrafe rajouté à l'extrémité 3' ou aux deux extrémités 3' et 5'. La stabilité de la structure en agrafe terminale dépend de la nature des bases engagées dans l'appariement intramoléculaire et ne dépend pas, dans ce mode de réalisation, de la séquence anti-sens. Elle est, par conséquent, indépendante de la séquence cible.

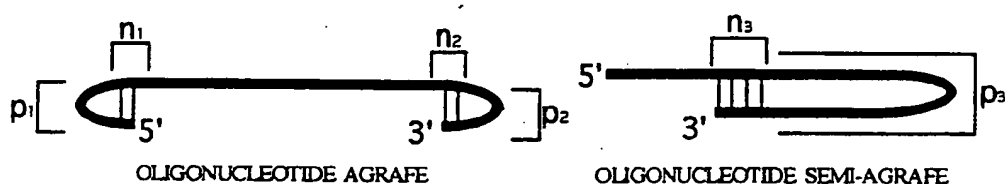
Dans un mode de réalisation contraire à la présente invention, où la séquence anti-sens d'intérêt se chevauche avec la séquence auto-appariée, la stabilité de la structure secondaire responsable de la résistance aux nucléases est par principe limitée. D'une part, un appariement intramoléculaire trop stable inhiberait la formation du duplex cible/antisens. D'autre part, la nature des bases engagées dans l'appariement intramoléculaire est partiellement imposée par le choix de la séquence cible. Ainsi, par exemple, lorsque les bases "imposées" par la séquence cible dans l'appariement intracaténaire seront des adénines ou des thymines, formant des appariements moins stables, la stabilité de la structure secondaire induite sera plus faible que si ces bases étaient des guanines ou des cytosines et, par suite, la résistance aux nucléases s'en trouvera réduite. En outre, lorsque les bases "imposées" sont des adénines ou des thymines, formant des appariements moins stables, il est nécessaire, pour obtenir une stabilité suffisante de la structure secondaire, d'augmenter la longueur du segment double-brin, et par conséquent la longueur du fragment rajouté en 3', et par suite la longueur totale de l'oligonucléotide. Et, pour des stabilités de structures secondaires équivalentes, un oligonucléotide plus long aura davantage de chances de s'apparier de manière non spécifique et d'induire de la toxicité. Les oligonucléotides antisens présentent en effet parfois une toxicité résultant d'appariements parasites avec des séquences partiellement homologues à la séquence cible. Dans le mode de réalisation selon la présente invention, la stabilité des structures secondaires caractérisant les oligonucléotides agrafes ou semi-agrafes peut être augmentée sans limitation, assurant ainsi une protection maximale contre les nucléases, sans nuire à l'hybridation de l'oligonucléotide antisens sur sa cible.

Les oligonucléotides selon la présente invention peuvent être utilisés dans leur état naturel mais peuvent cependant comporter également des nucléotides modifiés dans leurs liaisons internucléotidiques, dans les cycles osidiques ou dans les bases, dans le but de favoriser la pénétration cellulaire, et/ou la résistance aux nucléases, et/ou renforcer ou stabiliser leur hybridation avec une séquence

complémentaire. Les oligonucléotides suivant l'invention pouvant comporter en outre des groupements intercalants ou réactifs, ou être associés physiquement à d'autres molécules ou macromolécules dans le but de renforcer leur efficacité d'inhibition, leur pénétration, leur affinité pour les cibles, leur ciblage cellulaire ou intracellulaire, ou pour optimiser toute autre propriété.

Sont donc comprises dans l'invention, toute molécule d'ADN, ou d'ARN, ou mixte ADN/ARN, monocaténaire, obtenue de façon biologique, chimique, ou par des procédés associant les techniques de la chimie de synthèse à celles de la biologie et de la biochimie, dont la séquence primaire des nucléotides qui la composent induit l'apparition d'une structure secondaire particulière définie par la présence au minimum de l'appariement des deux dernières bases situées à l'extrémité 3' de la séquence avec deux bases nucléotidiques consécutives situées au sein de la même molécule, et présentant une résistance aux exonucléases supérieure à celle d'un oligonucléotide de longueur et composition nucléotidique identique mais linéaire.

Les molécules satisfaisant à cette définition peuvent être subdivisées en deux catégories, les molécules agrafes et les molécules semi-agrafes, et représentées schématiquement de la manière suivante:



où p_1 , p_2 et p_3 représentent les nombres de nucléotides constituant les boucles et sont variables d'un oligonucléotide à l'autre;
 n_1 , n_2 et n_3 représentent les nombres de nucléotides impliqués dans les appariements intracaténaires; ils sont variables d'un oligonucléotide à l'autre mais nécessairement supérieurs à 2
 Il résulte de cette structure qu'à l'extrémité, ou aux deux extrémités 3' et 5', les n_i (au moins deux) bases terminales impliquées dans un appariement intracaténaire sont immédiatement suivies ou précédées de p_i bases (au moins deux) non appariées, constituant une zone charnière en épingle à

cheveux. La dite zone charnière est donc adjacente à une autre zone de n_i (au moins deux) nucléotides consécutifs complémentaires des n_i dites bases terminales.

La boucle constituant les agrafes comporte donc une séquence
5 oligonucléotidique charnière d'au moins 1, de préférence de 3 à 25 nucléotides, et de préférence encore, de 4 à 20 nucléotides. En effet, si la zone charnière est de taille trop importante, la stabilité de l'hybridation intracaténaire se trouve fragilisée.

Dans un mode de réalisation, l'oligonucléotide agrafe est constitué
10 par une séquence d'intérêt d'ADN ou mixte ADN/ARN linéaire complémentaire d'une séquence cible d'ADN ou d'ARNm dont on désire bloquer l'expression, à l'extrémité 3' ou aux deux extrémités 3' et 5' de laquelle on a rajouté une boucle consistant en une séquence d'ADN ou mixte ADN/ARN auto-appariée comportant 8 à 12 nucléotides, ladite
15 séquence auto-appariée étant caractérisée par l'appariement de son extrémité 3' avec son extrémité 5' et de la totalité de ses nucléotides deux à deux à l'exception de ceux constituant une séquence dite charnière. Dans ce cas particulier d'oligonucléotide semi-agrafe, ladite boucle ou séquence auto-appariée est en "épingle à cheveux", l'extrémité 5' est appariée à
20 l'extrémité 3' et la totalité des nucléotides n'appartenant pas à la zone dite charnière sont appariés deux à deux.

Un exemple de ce type de fragment est présenté sur les figures 2, 4 et 5 de la présente description. Il s'agit, dans ce cas, d'un fragment octamérique dont la structure secondaire intrinsèque, particulièrement
25 stable, a été étudiée. Ce fragment appartient à une famille de fragments de stabilités variables, dont la présente invention a validé l'intérêt en tant que fragment stabilisateur d'oligonucléotides semi-agrafes. On a démontré, selon la présente invention, qu'il existe une corrélation entre la stabilité thermodynamique des structures secondaires de ces fragments et la protection contre les nucléases qu'ils induisent lorsqu'ils constituent
30 l'épingle à cheveux d'oligonucléotides semi-agrafes.

On cite en particulier un oligonucléotide constitué par une séquence anti-sens d'intérêt comportant à son extrémité 3' ou aux deux extrémités 3' et 5' une boucle de 8 nucléotides dans laquelle l'auto-appariement est dû à 4 nucléotides seulement, à savoir deux GC en 5' et 3'.
35

Dans ce cas, la composition de la séquence charnière influe sur la stabilité de la boucle et on utilise de préférence l'une des séquences GCGAAAGC, GCTAAAGC, GCGAGAGC, GCGATAGC, GCGAATGC, GCGTTAGC, qui forment des auto-appariements très stables.

5 Différents nucléotides peuvent rentrer dans la formulation d'oligonucléotides agrafes ou semi-agrafes. Les oligonucléotides agrafes et semi-agrafes faisant l'objet de la présente invention sont composés par une séquence de bases nucléotidiques comportant notamment de l'adénine (A), de la guanine (G), de la cytosine (C), de la thymine (T) et de l'uracile
10 (U), reliées entre elles par des liaisons internucléotidiques, notamment naturelles c'est-à-dire phosphodiesters. Les formules générales de ces bases sont présentées en figure 1.

 Les oligonucléotides agrafes et semi-agrafes selon l'invention peuvent également comporter des nucléotides rares (Inosine, I, ou rI par
15 exemple) ou des nucléotides modifiés, soit en série désoxyribo- soit en série ribo-.

 Les oligonucléotides agrafes et semi-agrafes selon l'invention peuvent comporter des nucléotides réactifs, capables d'établir des liens avec la séquence de la molécule cible complémentaire à l'oligonucléotide
20 ou, dans une autre application, des liens intramoléculaires au sein même de l'oligonucléotide agrafe ou semi-agrafe.

 Ainsi, les oligonucléotides agrafes et semi-agrafes selon l'invention peuvent porter des groupements réactifs greffés sur les nucléotides, comme par exemple des groupements psoralènes, ou d'autres agents de
25 pontage ou agents intercalant pouvant réagir avec la séquence de la molécule cible complémentaire à l'oligonucléotide. Dans un cas particulièrement intéressant des groupements réactifs greffés sur certains des nucléotides de l'oligonucléotide agrafe ou semi-agrafe pourront induire la formation d'un pontage intramoléculaire au sein
30 même de la molécule.

 L'oligonucléotide pourra comporter des liaisons internes produites par des agents réactifs appartenant ou n'appartenant pas à la structure de la molécule elle-même.

 Font également partie de l'invention des oligonucléotides agrafes
35 ou semi-agrafes, dits chimériques, constitués par l'assemblage covalent de

fragments nucléotides et non-nucléotides. Dans un cas particulièrement intéressant d'oligonucléotide agrafe ou semi-agrafe chimérique la ou les dites zones charnière seront de nature non-nucléotidique.

Font également partie de l'invention des oligonucléotides antisens
5 agrafes ou semi-agrafes couplés à des molécules permettant d'accroître leur pénétration intra-cellulaire, et en particulier des groupement lipophiles, des polypeptides ou des protéines.

D'une façon générale les oligonucléotides agrafes ou semi-agrafes décrits précédemment et faisant l'objet de l'invention sont destinés à
10 fournir de nouveaux oligonucléotides stables capables d'être internalisés dans les cellules et d'interagir ensuite avec des facteurs cellulaires ou viraux présentant une affinité pour des séquences spécifiques d'acides nucléiques.

Ainsi, les oligonucléotides selon l'invention peuvent comporter un
15 ou des groupement(s) lipophile(s) ou toute autre structure moléculaire favorisant la pénétration, le ciblage, l'adressage cellulaire ou intra-cellulaire de ces oligonucléotides, ou stabilisant la structure de ces oligonucléotides.

Les duplexes ADN/ARN sont substrats de la RNase H. C'est pourquoi
20 il peut être avantageux que la dite séquence d'intérêt comporte une séquence d'ADN ou d'ARN de manière à former un duplex ADN/ARN avec la séquence cible d'ARNm ou ADN respectivement.

Dans ce cas, il peut être approprié d'avoir recours à un oligonucléotide mixte avec, par exemple, une fenêtre d'ADN encadrée par
25 deux séquences d'ARN ou, inversement, constituant les agrafes. Des exemples concrets de certaines de ces structures sont représentées en figure 4.

Les oligonucléotides suivant l'invention peuvent par conséquent être obtenus par les méthodes conventionnelles de synthèse des
30 oligonucléotides naturels, par voie chimique, biologique, ou par des approches faisant appel à des combinaisons des techniques de la chimie de synthèse et de la biologie moléculaire.

Parmi les méthodes qualifiées de conventionnelles, diverses méthodes de synthèse chimique d'oligonucléotides naturels ont été
35 développées et sont bien connu des spécialistes travaillant dans le domaine. Par exemple, une méthode consiste à utiliser un support solide dit CPG (controlled pore glass) sur lequel le premier nucléoside est fixé

covalement par un bras de couplage, par l'intermédiaire de son extrémité 3'OH. L'extrémité 5'OH du nucléoside est protégé par un groupe di-p-méthoxytrityl acido-labile. Cette approche, utilisant la chimie des phosphites triesters, et dans laquelle des désoxynucléosides 3'phosphoramidites sont utilisés comme synthons est appelée la méthode
5 des phosphoramidites (Caruthers, 1985). Cette approche est la plus utilisée actuellement et présente l'avantage d'être entièrement automatique.

Pour citer un second exemple, une autre approche utilisée pour la synthèse d'oligonucléotides est celle de la chimie des phosphonates
10 (Froehler et al, 1986).

Cette approche commence par la condensation d'un désoxynucléoside 3'-H-phosphonate avec un deoxynucléoside couplé à un support de verre de silice. Des cycles de condensation successifs conduisent à la synthèse d'oligonucléotides H-phosphonates. Ces
15 oligonucléotides sont oxydés en une étape pour donner les phosphodiester.

En utilisant l'une ou l'autre de ces techniques, ou tout autre procédure séquentielle permettant la synthèse de chaînes polynucléotidiques de séquence déterminée à l'avance, on obtient des oligonucléotides présentant la structure primaire désirée. Cette séquence
20 primaire est à l'origine des structures secondaires qu'adoptera spontanément la molécule en fonction de sa séquence nucléotidique et des paramètres physico-chimiques des solutions dans lesquelles elle se trouvera.

L'obtention d'un oligonucléotide agrafe ou semi-agrafe se fera par le choix d'une séquence primaire induisant la formation à l'extrémité 3' ou aux deux extrémités 3' et 5' de la molécule des structures secondaires caractérisant les oligonucléotides agrafes ou semi-agrafes selon
25 l'invention.

On prépare une séquence comportant ladite séquence anti-sens d'intérêt qui elle-même pourrait éventuellement adopter un auto-appariement, et on ajoute à l'extrémité 3' ou aux extrémités 3' et 5' de cette séquence anti-sens d'intérêt une séquence nucléotidique supplémentaire dont la nature des bases et la longueur permettent un auto-appariement stable de ladite séquence supplémentaire impliquant au moins ses deux
30 bases terminales en 3' pour la séquence supplémentaire à l'extrémité 3', et en 5' pour la séquence supplémentaire à l'extrémité 5' le cas échéant.

Les oligonucléotides agrafes et semi-agrafes faisant l'objet de l'invention décrite ici pourront être utilisés dans tous les cas où il sera avantageux de disposer d'un oligonucléotide incluant une séquence primaire définie, présentant une résistance accrue aux exonucléases et un
5 risque moindre d'appariement avec des séquences partiellement complémentaires par rapport à un oligonucléotide linéaire incluant la même séquence primaire.

Les oligonucléotides agrafes et semi-agrafes pourront en particulier être utilisés comme agents antisens pour agir de façon
10 spécifique sur la transcription ou la traduction de protéine(s) dont on désire moduler le niveau d'expression dans un but de recherche ou de thérapeutique. La présente invention a donc pour objet l'utilisation des oligonucléotides selon l'invention, à titre de médicament.

Les quelques applications possibles qui sont données ci-dessous ne
15 sont que des exemples non-exhaustifs et en aucun cas limitatifs de situations dans lesquelles une approche de type antisens pourrait être utile, et où l'utilisation d'oligonucléotides naturels résistants aux exonucléases et présentant une toxicité des plus réduites offre un avantage.

De façon générale, les oligonucléotides agrafes et semi-agrafes
20 trouvent des terrains d'applications particulièrement adaptés dans le domaine de la dermatologie en raison de l'accessibilité des cibles à traiter, et de la toxicité mineure ou inexistante de ces composés. Toutes les affections dermatologiques, pouvant relever d'un mécanisme de
25 dysfonctionnement génétique pour lesquelles on peut identifier un facteur étiologique, en connaître la séquence du gène, et/ou de l'ARN messager permet d'appliquer une approche anti-sens.

L'utilisation d'oligonucléotides phosphodiester naturels, présentant la toxicité la plus réduite, permet d'envisager la possibilité de
30 ce genre d'approche pour des affections graves ou mineures, et même éventuellement pour des utilisations de type cosmétologiques, c'est-à-dire sur peau saine, et dans un domaine d'application où les toxicités des produits doivent être nulles.

A côté des cibles virales définies plus loin, de nombreuses maladies
35 dermatologiques peuvent être traitées par des oligonucléotides agrafes ou semi-agrafes résistants aux exonucléases. Parmi les cibles potentielles de telles approches, on peut noter les maladies inflammatoires telles que les

dermatites atopiques ou le lupus érythémateux, les maladies de la
kératinisation comme l'ichtyose et le psoriasis, et les maladies tumorales
comme le mélanome ou le lymphome T cutané. Ainsi par exemple, des
oligonucléotides antisens agraphes ou semi-agrafes appliqués à la
5 dermatologie peuvent être dirigés contre des ARN messagers de médiateurs
de l'inflammation comme des interleukines, contre des RNA messagers de
protéines impliquées dans les troubles de la prolifération des cellules
épidermiques, ou bien contre des ARN messagers codant pour des
protéines impliquées éventuellement dans le vieillissement cutané
10 phénotypique, comme par exemple la collagénase, l'élastase, les
transglutaminases.

De façon plus générale, les oligonucléotides agraphes et semi-agrafes
peuvent par exemple être utilisés comme agents antiviraux, antisens, que
ce soit pour des indications topiques (dermatologiques) ou pour des
15 indications systémiques. Par exemple, de tels oligonucléotides peuvent
êtres utilisés comme agents anti-herpétiques (HSV 1 et HSV 2, CMV, EBV),
comme agents anti-papillomavirus (HPV cutanés, génitaux, laryngés ou
autres), comme agents anti-hépatites (HBV, HCV, HDV), comme agents anti-
HIV (HIV-1 et HIV-2), comme agent anti-HTLV (HTLV-1 ou HTLV-2), etc..

20 Ces oligonucléotides agraphes ou semi-agrafes peuvent également
être utilisés comme agents de répression de l'expression de certaines
protéines cellulaires directement responsables ou impliquées dans
l'étiologie de maladies de la prolifération et de la différenciation
cellulaire. Par exemple, ces oligonucléotides agraphes ou semi-agrafes
25 peuvent être dirigés contre l'expression d'oncogènes cellulaires hyper-
exprimés ou exprimés de façon incontrôlés dans des types cellulaires
tumoraux (RAS, ERB, NEU, SIS, MYC, MYB, etc...).

En particulier, ces oligonucléotides agraphes ou semi-agrafes
naturels résistants aux exonucléases sériques peuvent êtres utilisés comme
30 agent antisens dirigés contre des ARN messagers d'oncogènes exprimés
dans des cellules leucémiques et impliqués dans leur prolifération. Dans le
cadre du traitement de certaines leucémies, pour des greffes de moëlle, les
oligonucléotides agraphes ou semi-agrafes peuvent êtres utilisés dans le
cadre d'applications "ex vivo".

35 Pour ces nombreuses indications, des formulations galéniques
adéquates doivent être établies afin d'optimiser la délivrance de ces
molécules à leurs cellules cibles. Ainsi, par exemple, des oligonucléotides

agrafes ou semi-agrafes pourront être encapsulés dans des liposomes, des nano-particules, des particules LDL, ou dans tout autre type de micro-sphère permettant une conservation adéquate, et favorisant le ciblage. Les molécules oligonucléotidiques agraphes ou semi-agrafes peuvent également être associées à des agents surfactants cationiques. Il est bien évident que ces quelques exemples ne sont ni exhaustifs ni limitatifs.

Les oligonucléotides agraphes ou semi-agrafes faisant l'objet de l'invention décrite ici, sont donc susceptibles d'être inclus dans toutes sortes de préparations pharmaceutiques, parapharmaceutiques, cosmétologiques, ou destinées à des dosages d'acides nucléiques ou de diagnostic, à des concentrations variables selon les indications, avec les excipients appropriés.

La présente invention a aussi pour objet un procédé de modulation de l'expression génétique d'une séquence cible appartenant à un ARN messenger ou à un ADN, caractérisé en ce qu'on hybride la dite séquence cible avec un oligonucléotide selon l'invention comportant une séquence complémentaire à la dite séquence cible.

Ce type de procédé peut être mis en oeuvre à des fins de recherche, thérapeutique ou diagnostic, dans des conditions *in vitro*, *in vivo* ou *ex vivo*.

III . EXEMPLES DE RÉALISATIONS DE L'INVENTION

D'autres caractéristiques et avantages de la présente invention apparaîtront à la lumière des exemples qui vont suivre en référence aux figures 1 à 7.

La **FIGURE 1** représente la structure des bases composant les oligonucléotides et la structure de la liaison phosphodiester reliant les oligonucléotides naturels entre eux.

La **FIGURE 2** représente des exemples d'oligonucléotides adoptant des structures secondaires en agrafe (a), en semi-agrafe (b et c) ou en semi-agrafe "épingle à cheveux".

La **FIGURE 3** représente des exemples de méthodes d'obtention oligonucléotides semi-agrafes avec en (a) l'obtention d'un oligonucléotide semi-agrafe par addition d'une structure oligonucléotidique auto-appariée à l'extrémité 3' d'un oligonucléotide linéaire; et en (b) l'obtention d'un oligonucléotide semi-agrafe par addition à l'extrémité 3' d'un

oligonucléotide linéaire d'un autre oligonucléotide linéaire dont la séquence 3' terminale est complémentaire à un fragment de la séquence du premier oligonucléotide.

La **FIGURE 4** représente en (a) les oligonucléotides agrafes (HA12),
5 semi-agrafes (SA12, RA12, HA12/m1, RA12/m1) et linéaires (POLYA12, SA12/m1, HA12/m2) utilisés dans les expériences de dégradation par les enzymes sériques; et en (b) des oligonucléotides anti-sens anti-HSV-1 semi-agrafes (HMV10, SMV10) et linéaires (MV10, SMV10/m1) utilisés dans les expériences de dégradation par les enzymes sériques et les tests
10 d'inhibition de la prolifération du virus de l'herpès simplex de type 1 (HSV-1).

Les **FIGURES 5a** à **5e** représentent les électrophorèses en conditions dénaturantes d'oligonucléotides agrafes, semi-agrafes ou linéaires après incubation en présence de 10% de sérum de veau foetal.

15 Les **FIGURES 6a** et **6b** représentent les demi-vies d'oligonucléotides agrafes, semi-agrafes ou linéaires incubés en présence de 10% de sérum de veau foetal.

La **FIGURE 7** représente l'inhibition de la prolifération du virus de l'herpès simplex de type 1 (HSV-1) par un oligonucléotide anti-sens semi-agrafe (SMV10) et un mutant anti-sens linéaire ciblé sur la même
20 séquence (SMV10/m1).

Les exemples expérimentaux sont donnés ci-dessous pour illustrer les avantages d'un oligonucléotide agrafe ou semi-agrafe incluant une séquence nucléotidique linéaire donnée sur des oligonucléotides incluant
25 la même séquence linéaire mais ne présentant de structure secondaire ni en agrafe, ni en semi-agrafe. Pour chaque comparaison un premier oligonucléotide phosphodiester linéaire a été synthétisé.

A partir de cette séquence linéaire des oligonucléotides plus longs ont été synthétisés constitués de la même séquence linéaire prolongée à
30 son extrémité 3', ou à ses deux extrémités 3' et 5' par des séquences oligonucléotidiques induisant l'apparition d'une structure secondaire en agrafe ou en semi-agrafe. Des mutants de ces molécules ont aussi été synthétisés par modification d'un nombre minimum de nucléotides permettant la déstabilisation des structures secondaires en agrafe ou semi-agrafe.
35 agrafe. Ces mutants sont ainsi des molécules linéaires de longueur égale à celle des molécules en agrafe ou semi-agrafe et incluant la même séquence linéaire initiale.

**Exemple 1 : Résistance des oligonucléotides agrafes et
semi-agrafe aux nucléases sériques**

Les oligonucléotides agrafes ou semi-agrafes présentent une
5 résistance à la dégradation nucléolytique supérieure à celle
d'oligonucléotides linéaires de séquence voisine lorsqu'ils sont incubés en
présence de sérum.

Pour ces expériences deux familles d'oligonucléotides ont été
synthétisés conformément à la description ci-dessus. La première famille
10 a été construite à partir d'une séquence linéaire homonucléotidique
polyadénylate (POLYA12), à partir de laquelle une séquence en agrafe
(HA12) et des séquences en semi-agrafes (HA12/m1, SA12, RA12, RA12/m1)
de natures différentes ont été construites. Des mutants linéaires de
longueurs égales à deux de ces molécules sont désignés respectivement par
15 HA12/m2 et SA12/m1. En guise de contrôle supplémentaire des
polyadénylates de longueurs égales à HA12, SA12 et RA12 ont également
été synthétisés et étudiés. La deuxième famille a été construite à partir
d'un duodécamère hétéronucléotidique linéaire (MV10) complémentaire à
la jonction d'épissage d'un ARN messager précoce du virus de l'herpès
20 simplex de type 1. Des séquences en semi-agrafes de différentes natures et
de différentes tailles ont été synthétisés sur cette base linéaire : HMOV10
(semi-agrafe) et SMV10 (semi-agrafe). Un mutant linéaire de SMV10 a
également été synthétisé et étudié : SMV10/m1. Les formules chimiques de
l'ensemble de ces oligonucléotides et leur structure secondaire sont
25 indiquées sur la figure 4.

Pour ces expériences 1 µg de chacun des oligonucléotides 5'-³²P est
incubé à 37°C dans 10 µl de milieu MEM contenant 10% de sérum de veau
foetal. La cinétique de la réaction est suivie jusqu'à 10 heures et les
prélèvements effectués au cours du temps analysés sur gel de
30 polyacrylamide 20% en conditions dénaturantes. Les autoradiographies
des gels de dégradation sont présentées en figure 7. Les bandes
correspondants à la longueur initiale de chaque oligonucléotide sont
excisées du gel et leur radioactivité mesurée par effet Cerenkov sur un
compteur de radioactivité bêta.

Cette mesure permet la quantification en fonction du temps de la proportion d'oligonucléotide non dégradé et par suite une estimation chiffrée de la cinétique de sa dégradation en terme de demi-vie. Les demi-vies des différents oligonucléotides évaluées dans les conditions décrites ci-dessus sont récapitulées dans le tableau de la figure 6.

Ces expériences permettent de tirer les conclusions suivantes :

- les oligonucléotides linéaires, indépendamment de leur taille et de leur séquence sont dégradés rapidement par les nucléases du sérum; leur dégradation intervient dans les premières minutes de l'incubation et est complète après quelques heures;

- le temps de demi-vie d'un oligonucléotide linéaire, indépendamment de sa taille et de sa séquence en présence de 10% de sérum de veau foetal est compris entre 30 et 60 minutes;

- la dégradation des oligonucléotides linéaires est processive, et on observe l'apparition de produits de dégradation de longueur décroissante, devenant de plus en plus courts en fonction du temps, ce qui indique que la dégradation est principalement le fait d'exonucléases, et en particulier de 3'-exonucléases;

- en revanche les oligonucléotides agrafes ou semi-agrafes sont systématiquement plus résistants à la nucléolyse par les enzymes sériques, et une fraction non négligeable d'oligonucléotide non dégradé reste détectable même après plusieurs heures d'incubation à 37°C;

- les temps de demi-vie des oligonucléotides agrafes et semi-agrafes étudiés varient d'un minimum de 2 heures à un maximum de l'ordre de 8 heures et sont en bonne corrélation avec les stabilités respectives théoriques des structures secondaires en semi-agrafes dans lesquelles sont engagées leur extrémité 3' (Fig.6).

Ces résultats confirment que la dégradation des oligonucléotides phosphodiester dans le sérum est principalement le fait d'exonucléases et non pas d'endonucléases et mettent en évidence la résistance à l'activité nucléolytique des enzymes sériques des structures en agrafe ou en semi-agrafe.

Exemple 2 : Inhibition de la prolifération du virus de l'herpès simplex de type 1 (HSV-1) par un oligonucléotide antisens semi-agrafe

Les oligonucléotides SMV10 et SMV10/m1 dont les séquences sont
5 données en figure 6 ont été utilisées dans ces expériences.
L'oligonucléotide SMV10 comprend d'une part le fragment linéaire MV10,
complémentaire sur 12 bases de la jonction d'épissage d'un ARN messager
précoce du cycle de réplication du virus HSV-1 et d'autre part une
extrémité 3' prolongée en semi-agrafe octamérique. Le mutant SMV10/m1
10 comprend la même séquence antisens MV10 que SMV10 mais une mutation
à été introduite dans la séquence octamérique terminale, mutation qui
confère à SMV10/m1 une structure linéaire.

Infection des cellules en présence ou en l'absence d'oligonucléotides

15 Les cellules (cellules Véro ATCC cultivées en milieu Gibco-MEM
complémenté de 5% de sérum de veau foetal, de L-glutamine, d'acides
aminés non-essentiels et de pénistrep) sontensemencées la veille de
l'infection à une densité de 50 000 cellules par puits de 2 cm². 16 à 24
heures plus tard, les cellules sont infectées avec HSV-1 à une multiplicité
20 d'infection de 3 pfu/cellule en présence ou en l'absence
d'oligonucléotides.

50 µl d'oligonucléotides en solution dans du milieu de culture 2X
exempt de sérum sont déposés sur la monocouche cellulaire.
50 µl de solution virale sont déposés 5 minutes plus tard. Les cellules sont
25 incubées pendant 1 heure à 37°C et agitées précautionneusement toutes les
15 minutes. Après 1 heure d'incubation, les 100 ml de milieu sont aspirés et
500 ml de milieu complet sont ajoutés sur les cellules. L'incubation est
poursuivie 24 heures avant d'être arrêtée par congélation des plaques
dans l'azote liquide.

30 Toutes les mesures d'inhibition sont effectuées en duplicat ou en
triplicat.

Titration du virus

Les virus sont récupérés directement dans le milieu de culture
après 3 cycles rapides de congélation dans l'azote liquide - décongélation à
35 37°C. Ils sont ensuite dilués en milieu sans sérum pour effectuer la
titration proprement dite.

Les cellules indicatrices sont ensemencées la veille en milieu complet à raison de 250 000 cellules par puits de 2 cm². Le lendemain, le milieu est aspiré et on dépose 100 ml des différentes dilutions virales par puits. Après une incubation d'une heure à 37°C avec agitation toutes les 15 minutes, le milieu est aspiré et les cellules sont recouvertes par du milieu complet (2.5% en sérum) contenant 1.2% de méthyl-cellulose pour une incubation de 3 jours à 37°C.

Après 3 jours, le milieu est éliminé, les cellules sont fixées avec une solution de PBS/10% formol pendant 20 minutes puis colorées par une solution 2% cristal violet dans du PBS/20% éthanol pendant 20 minutes. Les plaques sont ensuite rincées et les plages comptées par transparence sur le négatoscope. Les titrations sont effectuées en triple pour chaque point. Les calculs d'inhibition sont effectués par rapport aux titres viraux observés en l'absence de nucléotides.

15 Résultats

En expériences préliminaires, la cytotoxicité de SMV10 et SMV10/ml1 a été testée sur les cellules Véro. Pour des incubations de 1 heure à 37°C et des concentrations en oligonucléotides atteignant 50 µM aucune toxicité cellulaire n'a été détectée.

20 L'inhibition de la prolifération virale induite par SMV10 et SMV10/ml1, pour des concentrations allant de 10 µM à 30 µM est reportée sur la figure 7. Il y apparaît clairement que l'oligonucléotide semi-agrafe est actif à des concentrations inférieures à son mutant antisens linéaire. SMV10 induit 70% d'inhibition virale à 10 µM tandis que SMV10/ml1 est inactif à cette concentration.

Ce résultat confirme l'avantage, par rapport à une structure linéaire, du type de structure nucléotidique faisant l'objet de l'invention, dans le cadre de son utilisation comme agent antisens.

30 **Exemple 3 : Corrélation entre la stabilité thermodynamique des structures secondaires impliquées dans les oligonucléotides semi-agrafes et leur résistance à la dégradation par les nucléases sériques**

Dans ces expériences, différentes structures octamériques ayant la capacité d'adopter spontanément des structures secondaires en épingle à cheveux ont été utilisées pour prolonger, en 3', l'oligonucléotide antisens MV10 (ici GT3022) décrit dans les Exemples 1 et 2. Onze structures

octamériques de stabilités variables ont été étudiées. Ces structures ont été sélectionnées suivant deux critères: 1) leur capacité à former spontanément une épingle à cheveux octamérique en se repliant sur elle-même; 2) leur incapacité à venir s'hybrider partiellement à la séquence de GT3022, évitant ainsi l'apparition d'une structure secondaire alternative dans laquelle une partie de la séquence antisens serait engagée.

La mesure des températures de fusion de chacune de ces structures octamériques a été rapportée par Hirao et al., Nucleic Acid Research, 20 (15), 3891-3896, 1992. Les températures de fusion de ces structures caractérisent leur stabilité thermodynamique. Elles sont présentées dans le Tableau 1. Elles varient de 33°C pour la plus instable, extrémité 3' de GT3516, à 76.5°C pour la plus stable, extrémité 3' de SMV10 (ici GT3500). Deux d'entre elles n'ont pas de température de fusion, ce qui indique que leur structure secondaire présumée ne se forme vraisemblablement pas et que les extrémités 3' des oligonucléotides (GT3517, GT3518) dont elles constituent l'extrémité sont linéaires. Il est intéressant de noter que, dans cet exemple, toutes les épingles à cheveux sont formées par l'appariement intra-moléculaire d'une paire GC; ainsi, dans cet exemple, la stabilité thermodynamique des structures en épingle à cheveux est modulée par la composition de la boucle non-appariée de la structure.

La résistance à la dégradation par les nucléases sériques de ces oligonucléotides a été analysée suivant le protocole décrit dans l'exemple 1. La demi-vie dans le sérum de chacun de ces oligonucléotides est reportée dans le Tableau 1.

L'ensemble des données présentées dans le Tableau 1 confirme que la présence d'une structure auto-appariée à l'extrémité 3' d'un oligonucléotide augmente de manière significative sa résistance aux nucléases sériques. Cette résistance est proportionnelle à la stabilité thermodynamique des dites structures auto-appariées.

OLIGO	SEQUENCE	TAILLE	STRUCTURE SECONDAIRE POSSIBLE	T _m	DEMI-VIE DANS LE SERUM
TG3022	TTCCTCCTGGG	12	-	-	< 0,5 h
GT3500	TTCCTCCTGGGGCGAAAGC	20	TTCCTCCTGGGGCGA CGAA	76,5°C	> 4 h
GT3514	TTCCTCCTGGGGCGAAAGC	20	TTCCTCCTGGGGCGA CGAA	60-63°C	< 1 h
GT3515	TTCCTCCTGGGGCTAAAGC	20	TTCCTCCTGGGGCTA CGAA	55-58°C	< 1 h
GT3516	TTCCTCCTGGGGCTTTTGC	20	TTCCTCCTGGGGCTT CGTT	33°C	< 0,5 h
GT3517	TTCCTCCTGGGGCGTTTGC	20	TTCCTCCTGGGGCGT CGTT	NON	< 0,5 h
GT3518	TTCCTCCTGGGGCGAAAGC	20	TTCCTCCTGGGGCGA CGAA	NON	< 1 h
GT3519	TTCCTCCTGGGGCGTAAGC	20	TTCCTCCTGGGGCGT CGAA	71,5°C	> 6 h
GT3520	TTCCTCCTGGGGCGAGAGC	20	TTCCTCCTGGGGCGA CGAG	71,5°C	> 4 h
GT3521	TTCCTCCTGGGGCGATAGC	20	TTCCTCCTGGGGCGA CGAT	71°C	> 6 h
GT3522	TTCCTCCTGGGGCGAATGC	20	TTCCTCCTGGGGCGA CGTA	70°C	> 4 h
GT3523	TTCCTCCTGGGGCGTTAGC	20	TTCCTCCTGGGGCGT CGAT	69,5°C	> 6 h

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES CITEES DANS LE TEXTE

- Andrus, A.; Geiser, T.; Zon, G. (1989), *Nucleosides Nucleotides*, 8, 5-6, 967-8
- Anfossi, Giovanni; Gewirtz, Alan M.; Calabretta, Bruno, (1989), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 86, 3379-83
- 5 Bazile D; Gautier C; Rayner B; Imbach JL; Paoletti C; Paoletti J, (1989), *Nucleic Acids Res*, 17, 7749-59
- Bertrand JR; Imbach JL; Paoletti C; Malvy C, (1989), *Biochem Biophys Res Commun*, 164, 311-8
- 10 Caruthers, M.H. (1985) *Sciences*, 230, 281
- Cazenave, C.; Stein, C. A.; Loreau, N.; Thuong, N. T.; Neckers, L. M.; Subasinghe, C.; Helene, C.; Cohen, J. S.; Toulme, J. J., (1989), *Nucleic Acids Res.*, 17, 4255-73
- Chang, E. H.; Yu, Z.; Shinozuka, K.; Zon, G.; Wilson, W. D.; Strekowska, A., (1989), *Anti-Cancer Drug Des.*, 4, 221-32
- 15 Cope, F. O.; Wille, J. J., (1989), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 86, 5590-4
- Degols, G.; Leonetti, J.P.; Gagnor, C.; Lemaitre, M.; Lebleu, B., (1989), *Nucleic Acids Res.*, 17, 9341-50
- De Vroom E., Broxterman, H.J., Sliedregt, L.A.J., Van der Marel, G.A., Van Boom, J.H., (1988), *Nucl. Ac. Res.*, 16, 4607-4620
- 20 Dervan PB, (1986), *Science*, 232, 464-71
- Francois JC; Saison-Behmoaras T; Barbier C; Chassignol M; Thuong NT; Helene C, (1989), *Proc Natl Acad Sci*, 86, 9702-9706
- Francois JC; Saison-Behmoaras T; Chassignol M; Thuong NT; Helene C, (1989), *J Biol Chem*, 264 5891-5898
- 25 Francois JC; Saison-Behmoaras T; Helene C, (1988), *Nucleic Acids Res*, 16, 11431-11440
- Francois JC; Saison-Behmoaras T; Thuong NT; Helene C, (1989), *Biochemistry*, 28, 9617-9619
- 30 Froehler, B.C., Ng, P. and Matteucci, M.D. (1986) *Nucl. Acid Res.*, 14, 5399
- Gagnor, C., Bertrand, J.R., Thenet, S., Lemaitre, M., Morvan, F., Rayner, B., Malvy, C., Lebleu, B., Imbach, J.L., Paoletti, C., (1987), *Nucleic Acids Res.*, 15, 10419-36
- Gao, W., Stein, C.A., Cohen, J.S., Dutchmann, G. and Cheng, Y.C., (1988). *J. Biol. Chem.*, 264, 11521-11532
- 35

- Goodchild, John; Agrawal, Sudhir; Civeira, Maria P.; Sarin, Prem S.; Sun, Daisy; Zamecnik, Paul C., (1988), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **85**, 5507-11
- Jessus C; Chevrier M; Ozon R; Helene C; Cazenave C, (1989), *Gene*, **72**, 311-312
- 5 Kabanov, A. V.; Vinogradov, S. V.; Ovcharenko, A. V.; Krivonos, A. V.; Melik-Nubarov, N. S.; Kiselev, V. I.; Severin, E. S., (1990), *FEBS Lett.*, **259**, 327-30
- Leonetti, J.P, Degols, G., Milhaud, P., Gagnor, C., Lemaitre, M., Lebleu, B., (1989), *Nucleosides Nucleotides*, **8**, 5-6, 825-8
- 10 Maher, Louis J, III; Dolnick, Bruce J., (1988), *Nucleic Acids Res.*, **16**, 3341-58
- Markus-Sekura, Carol J.; Woerner, Amy M.; Shinozuka, Kazuo; Zon, Gerald; Quinnan, Gerald V., Jr., (1987), *Nucleic Acids Res.*, **15**, 5749-63
- Matsukura, Makoto; Zon, Gerald; Shinozuka, Kazuo; Robert-Guroff,
- 15 Miroshnichenko, O. I.; Ponomareva, T. I.; Tikhonenko, T. I., (1989), *Gene*, **84**, 83-9
- Perbost M; Lucas M; Chavis C; Pompon A; Baumgartner H; Rayner B; Griengl H; Imbach JL, (1989), *Biochem Biophys Res Commun*, **165**, 742-7
- Perroualt, L., Asseline, U., Rivalle, C., Thuong, N.Y., Bisagni, E., Sankar,
- 20 Sabita; Cheah, Keat Chye; Porter, Alan G., (1989), *Eur. J. Biochem.* **184**, 39-45
- Shuttleworth, John; Matthews, Glenn; Dale, Les; Baker, Chris; Colman, Alan, (1988), *Gene*, **72**, 1-2, 267-75
- Stevenson, Mario; Iversen, Patrick L, (1989), *J. Gen. Virol.*, **70**, 2673-82
- 25 Sun JS; Francois JC; Montenay-Garestier T; Saison-Behmoaras T; Roig V; Thuong NT; Helene C, (1989) *Proc Natl Acad Sci* **86**, 9198-9202
- Tortora, Giampaolo; Clair, Timothy; Cho-Chung, Yoon Sang, (1990), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **87**, 705-8
- Wang AH; Cottens S; Dervan PB; Yesinowski JP; van der Marel GA; van
- 30 Boom JH, (1989), *J Biomol Struct Dyn*, **7**, 101-17
- Westermann, P.; Gross, B.; Hoinkis, G., (1989), *Biomed. Biochim. Acta*, **48**, 85-93
- Zerial A; Thuong NT; Helene C, (1987), *Nucleic Acids Res*, **15**, 9909-9919
- Zheng, H., Sahai, Beni M., Kilgannon, P., Fotedar, A., Green, D. R., (1989),
- 35 *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **86**, 3758-62

IDENTIFICATEUR DE SEQUENCE

(1) INFORMATIONS GENERALES :

(i) DEPOSANT:

(A) NOM : GENSET
(B) RUE : 1 PASSAGE ETIENNE DELAUNAY
(C) VILLE : PARIS
(E) PAYS : FRANCE
(F) CODE POSTAL : 75011
(G) TELEPHONE : 33(1) 43 56 59 00
(H) TELEFAX : 33(1) 43 56 26 25

(ii) TITRE DE L'INVENTION : "OLIGONUCLEOTIDES AGRAFES ET SEMI-AGRAFES, PROCEDE DE PREPARATION ET APPLICATIONS"

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES : 23

(iv) FORME DECHIFFRABLE PAR ORDINATEUR :

(A) TYPE DE SUPPORT : DISQUETTE
(B) ORDINATEUR : MAC INTOSH
(C) SYSTEME D'EXPLOITATION : MAC OS - SYSTEME 7
(D) LOGICIEL : WORD PERFECT VERSION 2.0.

(v) DATE DE LA DEMANDE ACTUELLE

(A) NUMERO DE LA DEMANDE
(B) DATE DU DEPOT:

(vi) DATE DE LA DEMANDE ANTERIEURE :

(A) NUMERO DE LA DEMANDE : 93 03514
(B) DATE DE DEPOT : 26 MARS 1993

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID N° : 1 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

(A) LONGUEUR : 12 NUCLEOTIDES
(B) TYPE : ADN
(C) NOMBRE DE BRINS : MONOBRIN
(D) CONFIGURATION : LINEAIRE

(ii) TYPE DE MOLECULE : ACIDE NUCLEIQUE

(iii) ANTI-SENS : NON

(iv) TYPE DE FRAGMENT : SEQUENCE POLYADENYLATE

(v) CARACTERISTIQUE :

(A) NOM/CLE : POLYA12

(vi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N° : 1 :

AAAAAAAAAA AA

12

(3) INFORMATIONS POUR LA SEQUENCE N° : 2 :

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :
- (A) LONGUEUR : 20 NUCLEOTIDES
 - (B) TYPE : ADN
 - (C) NOMBRE DE BRINS : MONOBRIN
 - (D) CONFIGURATION : STRUCTURE SECONDAIRE AUTO-APPARIEE A L'EXTREMITE 3'
- (ii) TYPE DE MOLECULE : ACIDE NUCLEIQUE
- (iii) ANTI-SENS : NON
- (iv) TYPE DE FRAGMENT : SEQUENCE POLYADENYLEE
- (v) CARACTERISTIQUE :
- (A) NOM/CLE : SA12
- (vi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N° : 2 :

AAAAAAAAAA AAGCGAAAGC

20

(4) INFORMATIONS POUR LA SEQUENCE N° : 3 :

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :
- (A) LONGUEUR : 28 NUCLEOTIDES
 - (B) TYPE : ACIDE NUCLEIQUE
 - (C) NOMBRE DE BRINS : MONOBRIN
 - (D) CONFIGURATION : STRUCTURE SECONDAIRE AUTO-APPARIEE AUX EXTREMITES 3' ET 5'
- (ii) TYPE DE MOLECULE : ACIDE NUCLEIQUE
- (iii) ANTI-SENS : NON
- (iv) TYPE DE FRAGMENT : SEQUENCE POLYADENYLEE
- (v) CARACTERISTIQUE :
- (A) NOM/CLE : HA12
- (vi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N° : 3 :

GCGAAAGCAA AAAAAAAAAA GCGAAAGC

28

(5) INFORMATIONS POUR LA SEQUENCE N° : 4 :

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :
- (A) LONGUEUR : 34 NUCLEOTIDES
 - (B) TYPE : ADN
 - (C) NOMBRE DE BRINS : MONOBRIN
 - (D) CONFIGURATION : STRUCTURE SECONDAIRE AUTO-APPARIEE A L'EXTREMITE 3'

- (ii) TYPE DE MOLECULE : ACIDE NUCLEIQUE
(iii) ANTI-SENS : NON
(iv) TYPE DE FRAGMENT : SEQUENCE POLYADENYLEE
(v) CARACTERISTIQUE :
(A) NOM/CLE : RA12
(vi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N° : 4 :

AAAAAAAAAA AAGCTTCCTC CTGCGGGCGA AAGC

34

(6) INFORMATIONS POUR LA SEQUENCE N° : 5 :

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :
(A) LONGUEUR : 20 NUCLEOTIDES
(B) TYPE : ADN
(C) NOMBRE DE BRINS : MONOBRIN
(D) CONFIGURATION : LINEAIRE
(ii) TYPE DE MOLECULE : ACIDE NUCLEIQUE
(iii) ANTI-SENS : NON
(iv) TYPE DE FRAGMENT : SEQUENCE POLYADENYLEE
(v) CARACTERISTIQUE :
(A) NOM/CLE : SA12/m1
(B) AUTRES RENSEIGNEMENTS : MUTANT LINEAIRE SA12
(vi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N° : 5 :

AAAAAAAAAA AATAGAAAGC

20

(7) INFORMATIONS POUR LA SEQUENCE N° : 6 :

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :
(A) LONGUEUR : 28 NUCLEOTIDES
(B) TYPE : ADN
(C) NOMBRE DE BRINS : MONOBRIN
(D) CONFIGURATION : STRUCTURE SECONDAIRE AUTO-APPARIEE EN 3'
(ii) TYPE DE MOLECULE : ACIDE NUCLEIQUE
(iii) ANTI-SENS : NON
(iv) TYPE DE FRAGMENT : SEQUENCE POLYADENYLEE

- (v) CARACTERISTIQUE:
(A) NOM/CLE: HA12/m1
(B) AUTRES RENSEIGNEMENTS: MUTANT LINEAIRE EN 5'
DE HA12

(vi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N° : 6 :

CGGAAAGCAA AAAAAAAAAA GCGAAAGC

28

(8) INFORMATIONS POUR LA SEQUENCE N° : 7 :

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :
(A) LONGUEUR : 28 NUCLEOTIDES
(B) TYPE : ADN
(C) NOMBRE DE BRINS : MONOBRIN
(D) CONFIGURATION : LINEAIRE
- (ii) TYPE DE MOLECULE : ACIDE NUCLEIQUE
- (iii) ANTI-SENS : NON
- (iv) TYPE DE FRAGMENT : SEQUENCE POLYADENYLEE
- (v) CARACTERISTIQUE:
(A) NOM/CLE: HA12/m2
(B) AUTRES RENSEIGNEMENTS: MUTANT LINEAIRE EN 5'
ET 3'

(vi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N° : 7 :

CGGAAAGCAA AAAAAAAAAA TAGAAAGC

28

(9) INFORMATIONS POUR LA SEQUENCE N° : 8 :

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :
(A) LONGUEUR : 34 NUCLEOTIDES
(B) TYPE : ADN
(C) NOMBRE DE BRINS : MONOBRIN
(D) CONFIGURATION : STRUCRURE SECONDAIRE AUTO-
APPARIEE EN 3'
- (ii) TYPE DE MOLECULE : ACIDE NUCLEIQUE
- (iii) ANTI-SENS : NON
- (iv) TYPE DE FRAGMENT : SEQUENCE POLYADENYLEE
- (v) CARACTERISTIQUE:
(A) NOM/CLE: RA12/m1
(B) AUTRES RENSEIGNEMENTS: MUTANT DE RA12

(vi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N° : 8 :

AAAAAAAAAA AACGAACCTC CTGCGGGCGA AAGC

34

(10) INFORMATIONS POUR LA SEQUENCE N° : 9 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

(A) LONGUEUR : 12 NUCLEOTIDES
(B) TYPE : ADN
(C) NOMBRE DE BRINS : MONOBRIN
(D) CONFIGURATION : LINEAIRE

(ii) TYPE DE MOLECULE : ACIDE NUCLEIQUE

(iii) ANTI-SENS : OUI

(iv) TYPE DE FRAGMENT : SEQUENCE COMPLEMENTAIRE
A LA JONCTION D'EPISSAGE D'UN ARNm
PRECOCE DU VIRUS HSV1

(v) CARACTERISTIQUE :

(A) NOM/CLE : MV10 ou GT 3022

(vi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N° : 9 :

TTCTCTCTGC GG

12

(11) INFORMATIONS POUR LA SEQUENCE N° : 10 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

(A) LONGUEUR : 20 NUCLEOTIDES
(B) TYPE : ADN
(C) NOMBRE DE BRINS : MONOBRIN
(D) CONFIGURATION : STRUCTURE SECONDAIRE AUTO-
APPARIEE EN 3'

(ii) TYPE DE MOLECULE : ACIDE NUCLEIQUE

(iii) ANTI-SENS : OUI

(iv) TYPE DE FRAGMENT : SEQUENCE COMPLEMENTAIRE
A LA JONCTION D'EPISSAGE D'UN ARNm
PRECOCE DU VIRUS HSV1

(v) CARACTERISTIQUE :

(A) NOM/CLE : SMV10

(vi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N° : 10 :

TTCTCTCTGC GGGCGAAAGC

20

(12) INFORMATIONS POUR LA SEQUENCE N° : 11 :

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :
 - (A) LONGUEUR : 20 NUCLEOTIDES
 - (B) TYPE : ADN
 - (C) NOMBRE DE BRINS : MONOBRIN
 - (D) CONFIGURATION : LINEAIRE
- (ii) TYPE DE MOLECULE : ACIDE NUCLEIQUE
- (iii) ANTI-SENS : OUI
- (iv) TYPE DE FRAGMENT : SEQUENCE COMPLEMENTAIRE
A LA JONCTION D'EPISSAGE D'UN ARN_m
PRECOCE DU VIRUS HSV1
- (v) CARACTERISTIQUE :
 - (A) NOM/CLE : SMV10/m1
 - (B) AUTRES RENSEIGNEMENTS : MUTANT LINEAIRE
DE SMV10
- (vi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N° : 11 :

TTCCTCCTGC GGTAGAAAGC

20

(13) INFORMATIONS POUR LA SEQUENCE N° : 12 :

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :
 - (A) LONGUEUR : 28 NUCLEOTIDES
 - (B) TYPE : ADN
 - (C) NOMBRE DE BRINS : MONOBRIN
 - (D) CONFIGURATION : STRUCTURE SECONDAIRE AUTO-
APPARIEE EN 3'
- (ii) TYPE DE MOLECULE : ACIDE NUCLEIQUE
- (iii) ANTI-SENS : OUI
- (iv) TYPE DE FRAGMENT : SEQUENCE COMPLEMENTAIRE
A LA JONCTION D'EPISSAGE D'UN ARN_m
PRECOCE DU VIRUS HSV1
- (v) CARACTERISTIQUE :
 - (A) NOM/CLE : HNV10
 - (B) AUTRES RENSEIGNEMENTS : SEQUENCE MV10 PROLONGEE
EN 3' PAR UNE SEQUENCE
INDUISANT UN AUTO-APPA-
RIEMENT ET EN 5' PAR UNE
SEQUENCE LINEAIRE
- (vi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N° : 12 :

GCGAAAGCTT CCTCCTGCGG GCGAAAGC

28

(14) INFORMATIONS POUR LA SEQUENCE N° : 13 :

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :
 - (A) LONGUEUR : 34 NUCLEOTIDES
 - (B) TYPE : ADN
 - (C) NOMBRE DE BRINS : MONOBRIN
 - (D) CONFIGURATION : STRUCTURE SECONDAIRE
- (ii) TYPE DE MOLECULE : ACIDE NUCLEIQUE
- (iii) ANTI-SENS : OUI
- (iv) TYPE DE FRAGMENT : SEQUENCE COMPLEMENTAIRE
A LA JONCTION D'EPISSAGE D'UN ARN^m
PRECOCE DU VIRUS HSV1
- (v) AUTRES RENSEIGNEMENTS: SEQUENCE MV10 PROLONGEE PAR
DES EXTREMITES 5' ET 3' APPARIEES
ENTRE ELLES

(vi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N° : 13 :

GCGAAAGCTT CCTCCTGCGG GAGGAAGCTT TCGC

34

(15) INFORMATIONS POUR LA SEQUENCE N° : 14 :

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :
 - (A) LONGUEUR : 20 NUCLEOTIDES
 - (B) TYPE : ADN
 - (C) NOMBRE DE BRINS : MONOBRIN
 - (D) CONFIGURATION : STRUCTURE SECONDAIRE A L'EXTREMITÉ
3' AUTO-APPARIEE
- (ii) TYPE DE MOLECULE : ACIDE NUCLEIQUE
- (iii) ANTI-SENS : OUI
- (iv) TYPE DE FRAGMENT : SEQUENCE COMPLEMENTAIRE
A LA JONCTION D'EPISSAGE D'UN ARN^m
PRECOCE DU VIRUS HSV1
- (v) CARACTERISTIQUE :
 - (A) NOM/CLE : GT3514
 - (B) AUTRES RENSEIGNEMENTS: SEQUENCE MV10 PROLONGEE
PAR UNE SEQUENCE A STRUC-
TURE SECONDAIRE AUTO-
APPARIEE

(vi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N° : 14 :

TTCCTCCTGC GGGCAAAGC

20

(16) INFORMATIONS POUR LA SEQUENCE N° : 15 :

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :
 - (A) LONGUEUR : 20 NUCLEOTIDES
 - (B) TYPE : ADN
 - (C) NOMBRE DE BRINS : MONOBRIN
 - (D) CONFIGURATION : STRUCTURE SECONDAIRE A L'EXTREMITÉ 3' AUTO-APPARIEE
- (ii) TYPE DE MOLECULE : ACIDE NUCLEIQUE
- (iii) ANTI-SENS : OUI
- (iv) TYPE DE FRAGMENT : SEQUENCE COMPLEMENTAIRE A LA JONCTION D'EPISSAGE D'UN ARN^m PRECOCE DU VIRUS HSV1
- (v) CARACTERISTIQUE :
 - (A) NOM/CLE : GT3515
 - (B) AUTRES RENSEIGNEMENTS : SEQUENCE MV10 PROLONGEE PAR UNE SEQUENCE A STRUCTURE SECONDAIRE AUTO-APPARIEE
- (vi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ.ID N° : 15 :

TTCCTCCTGC GGGCTAAAGC

20

(17) INFORMATIONS POUR LA SEQUENCE N° : 16 :

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :
 - (A) LONGUEUR : 20 NUCLEOTIDES
 - (B) TYPE : ADN
 - (C) NOMBRE DE BRINS : MONOBRIN
 - (D) CONFIGURATION : STRUCTURE SECONDAIRE A L'EXTREMITÉ 3' AUTO-APPARIEE
- (ii) TYPE DE MOLECULE : ACIDE NUCLEIQUE
- (iii) ANTI-SENS : OUI
- (iv) TYPE DE FRAGMENT : SEQUENCE COMPLEMENTAIRE A LA JONCTION D'EPISSAGE D'UN ARN^m PRECOCE DU VIRUS HSV1
- (v) CARACTERISTIQUE :
 - (A) NOM/CLE : GT3516
 - (B) AUTRES RENSEIGNEMENTS : SEQUENCE MV10 PROLONGEE PAR UNE SEQUENCE A STRUCTURE SECONDAIRE AUTO-APPARIEE

(vi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N° : 16 :

TTCCTCCTGC GGGCTTTTGC

20

(18) INFORMATIONS POUR LA SEQUENCE N° : 17 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

- (A) LONGUEUR : 20 NUCLEOTIDES
- (B) TYPE : ADN
- (C) NOMBRE DE BRINS : MONOBRIN
- (D) CONFIGURATION : LINEAIRE

(ii) TYPE DE MOLECULE : ACIDE NUCLEIQUE

(iii) ANTI-SENS : OUI

(iv) TYPE DE FRAGMENT : SEQUENCE COMPLEMENTAIRE
A LA JONCTION D'EPISSAGE D'UN ARN_m
PRECOCE DU VIRUS HSV1

(v) CARACTERISTIQUE :

- (A) NOM/CLE : GT3517
- (B) AUTRES RENSEIGNEMENTS : SEQUENCE MV10 PROLONGEE
A L'EXTREMITÉ 3' PAR UNE
SEQUENCE NON AUTO-
APPARIEE

(vi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N° : 17 :

TTCCTCCTGC GGGCGTTTGC

20

(19) INFORMATIONS POUR LA SEQUENCE N° : 18 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

- (A) LONGUEUR : 20 NUCLEOTIDES
- (B) TYPE : ADN
- (C) NOMBRE DE BRINS : MONOBRIN
- (D) CONFIGURATION : LINEAIRE

(ii) TYPE DE MOLECULE : ACIDE NUCLEIQUE

(iii) ANTI-SENS : OUI

(iv) TYPE DE FRAGMENT : SEQUENCE COMPLEMENTAIRE
A LA JONCTION D'EPISSAGE D'UN ARN_m
PRECOCE DU VIRUS HSV1

(v) CARACTERISTIQUE :

- (A) NOM/CLE : GT3518
- (B) AUTRES RENSEIGNEMENTS : SEQUENCE MV10 PROLONGEE
A L'EXTREMITÉ 3' PAR UNE
SEQUENCE NON AUTO-
APPARIEE

(vi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N° : 18 :

TTCTCTCTGC GGGCAAAGC

20

(20) INFORMATIONS POUR LA SEQUENCE N° : 19 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

- (A) LONGUEUR : 20 NUCLEOTIDES
- (B) TYPE : ADN
- (C) NOMBRE DE BRINS : MONOBRIN
- (D) CONFIGURATION : STRUCTURE SECONDAIRE A L'EXTREMITÉ 3' AUTO-APPARIEE

(ii) TYPE DE MOLECULE : ACIDE NUCLEIQUE

(iii) ANTI-SENS : OUI

(iv) TYPE DE FRAGMENT : SEQUENCE COMPLEMENTAIRE
A LA JONCTION D'EPISSAGE D'UN ARN^m
PRECOCE DU VIRUS HSV1

(v) CARACTERISTIQUE :

- (A) NOM/CLE: GT3519
- (B) AUTRES RENSEIGNEMENTS: SEQUENCE MV10 PROLONGEE
A L'EXTREMITÉ 3' PAR UNE
SEQUENCE AUTO-APPARIEE

(vi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N° : 19 :

TTCTCTCTGC GGGCGTAAGC

20

(21) INFORMATIONS POUR LA SEQUENCE N° : 20 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :

- (A) LONGUEUR : 20 NUCLEOTIDES
- (B) TYPE : ADN
- (C) NOMBRE DE BRINS : MONOBRIN
- (D) CONFIGURATION : STRUCTURE SECONDAIRE A L'EXTREMITÉ 3' AUTO-APPARIEE

(ii) TYPE DE MOLECULE : ACIDE NUCLEIQUE

(iii) ANTI-SENS : OUI

(iv) TYPE DE FRAGMENT : SEQUENCE COMPLEMENTAIRE
A LA JONCTION D'EPISSAGE D'UN ARN^m
PRECOCE DU VIRUS HSV1

(v) CARACTERISTIQUE :

- (A) NOM/CLE: GT3520
- (B) AUTRES RENSEIGNEMENTS: SEQUENCE MV10 PROLONGEE
A L'EXTREMITÉ 3' PAR UNE
SEQUENCE AUTO-APPARIEE

(vi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N° : 20 :

TTCTCTCTGC GGGCGAGAGC

20

(22) INFORMATIONS POUR LA SEQUENCE N° : 21 :

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :
 - (A) LONGUEUR : 20 NUCLEOTIDES
 - (B) TYPE : ADN
 - (C) NOMBRE DE BRINS : MONOBRIN
 - (D) CONFIGURATION : STRUCTURE SECONDAIRE A L'EXTREMITE 3' AUTO-APPARIEE
- (ii) TYPE DE MOLECULE : ACIDE NUCLEIQUE
- (iii) ANTI-SENS : OUI
- (iv) TYPE DE FRAGMENT : SEQUENCE COMPLEMENTAIRE
A LA JONCTION D'EPISSAGE D'UN ARN^m
PRECOCE DU VIRUS HSV1
- (v) CARACTERISTIQUE :
 - (A) NOM/CLE GT3521
 - (B) AUTRES RENSEIGNEMENTS: SEQUENCE MV10 PROLONGEE
A L'EXTREMITE 3' PAR UNE
SEQUENCE AUTO-APPARIEE

(vi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N° : 21 :

TTCTCTCTGC GGGCGATAGC

20

(23) INFORMATIONS POUR LA SEQUENCE N° : 22 :

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :
 - (A) LONGUEUR : 20 NUCLEOTIDES
 - (B) TYPE : ADN
 - (C) NOMBRE DE BRINS : MONOBRIN
 - (D) CONFIGURATION : STRUCTURE SECONDAIRE A L'EXTREMITE 3' AUTO-APPARIEE
- (ii) TYPE DE MOLECULE : ACIDE NUCLEIQUE
- (iii) ANTI-SENS : OUI
- (iv) TYPE DE FRAGMENT : SEQUENCE COMPLEMENTAIRE
A LA JONCTION D'EPISSAGE D'UN ARN^m
PRECOCE DU VIRUS HSV1
- (v) CARACTERISTIQUE :
 - (A) NOM/CLE GT3522
 - (B) AUTRES RENSEIGNEMENTS: SEQUENCE MV10 PROLONGEE
A L'EXTREMITE 3' PAR UNE
SEQUENCE AUTO-APPARIEE

(vi). DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N° : 22 :

TTCCTCCTGC GGGCGAATGC

20

(24) INFORMATIONS POUR LA SEQUENCE N° : 23 :

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE :
 - (A) LONGUEUR : 20 NUCLEOTIDES
 - (B) TYPE : ADN
 - (C) NOMBRE DE BRINS : MONOBRIN
 - (D) CONFIGURATION : STRUCTURE SECONDAIRE A L'EXTREMITÉ 3' AUTO-APPARIEE
- (ii) TYPE DE MOLECULE : ACIDE NUCLEIQUE
- (iii) ANTI-SENS : OUI
- (iv) TYPE DE FRAGMENT : SEQUENCE COMPLEMENTAIRE
A LA JONCTION D'EPISSAGE D'UN ARN_m
PRECOCE DU VIRUS HSV1
- (v) CARACTERISTIQUE :
 - (A) NOM/CLE: GT3523
 - (B) AUTRES RENSEIGNEMENTS: SEQUENCE MV10 PROLONGEE
A L'EXTREMITÉ 3' PAR UNE
SEQUENCE AUTO-APPARIEE

(vi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N° : 23 :

TTCCTOCTGC GGGOGTTAGC

20

REVENDICATIONS

1. Oligonucléotide anti-sens semi-agrafe ou agrafe constitué d'une
séquence oligonucléotidique dont l'extrémité 3' ou les deux extrémités 3' et
5 5' sont engagées dans un auto-appariement intracaténaire stable
impliquant l'hybridation d'au moins les deux bases terminales de
l'extrémité 3' ou respectivement de chaque extrémité 3' et 5', avec un
même nombre de bases consécutives complémentaires situées sur le même
brin, de manière à former une boucle à l'extrémité 3' ou respectivement
10 une boucle à chaque extrémité 3' et 5' encadrant une séquence centrale,
ladite séquence centrale comprenant une séquence anti-sens d'intérêt
complémentaire d'une séquence cible appartenant à un ADN ou un ARN
messager dont on désire bloquer spécifiquement l'expression et lesdites
boucles ne comportant pas de séquences susceptibles de s'hybrider avec le
15 brin d'ADN ou d'ARNm portant la séquence cible.

2. Oligonucléotide semi-agrafe ou agrafe selon la revendication 1,
caractérisé en ce que la (ou lesdites) boucle(s) comporte(nt) une séquence
de nucléotides charnière non appariés intracaténairement, de 3 à 25, de
20 préférence de 4 à 20 nucléotides.

3. Oligonucléotide agrafe ou semi-agrafe selon l'une des
revendications 1 ou 2, caractérisé en ce qu'il est constitué par une
séquence d'intérêt d'ADN ou mixte ADN/ARN linéaire complémentaire
25 d'une séquence cible d'ADN ou d'ARNm dont on désire bloquer
l'expression, à l'extrémité 3' ou aux deux extrémités 3' et 5' de laquelle on
a rajouté une boucle consistant en une séquence d'ADN ou mixte ADN/ARN
auto-appariée comportant 8 à 12 nucléotides, ladite séquence auto-
appariée étant caractérisée par l'appariement de son extrémité 3' avec son
30 extrémité 5' et de la totalité de ses nucléotides deux à deux à l'exception de
ceux constituant une séquence dite charnière.

4. Oligonucléotide agrafe ou semi-agrafe selon l'une des
revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que les liaisons inter-
35 nucléotidiques sont des liaisons phosphodiester naturelles.

5. Oligonucléotide selon l'une des revendications 1 à 4 caractérisé en ce que ladite séquence anti-sens comporte une séquence d'ADN ou mixte ADN/ARN de manière à former un duplex ADN/ARN avec la séquence cible ARNm ou ADN respectivement.

5

6. Oligonucléotide selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce qu'il comporte une partie non-nucléotidique pouvant être un (ou des groupements) lipophile(s), ou tout autre structure moléculaire favorisant la pénétration, le ciblage ou l'adressage cellulaire ou intra-cellulaire ou stabilisant la structure de ces oligonucléotides.

10

7. Oligonucléotide selon la revendication 6, caractérisé en ce que la zone charnière de la boucle est constituée par un fragment non-nucléotidique.

15

8. Oligonucléotide selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce qu'il comporte dans sa séquence des nucléotides modifiés soit en série ribo- soit en série désoxyribo-.

20

9. Oligonucléotide selon l'une des revendications 1 à 8 caractérisé en ce qu'il comporte des groupements réactifs greffés sur ses nucléotides, comme par exemple des groupements psoralènes, ou d'autres agents de pontage ou agents intercalants pouvant réagir avec la séquence de la molécule cible complémentaire à l'oligonucléotide ou induire la formation de pontage intramoléculaire au sein même de la molécule.

25

10. Oligonucléotide selon l'une des revendications 1 à 8 caractérisé en ce qu'il comporte des liaisons internes produites par des agents réactifs appartenant ou n'appartenant pas à la structure de la molécule elle-même.

30

11. Oligonucléotide selon l'une des revendications 1 à 10 caractérisé en ce qu'il est constitué par une séquence anti-sens d'intérêt comportant à son extrémité 3' ou aux deux extrémités 3' et 5' une des séquences GCGAAAGC, CGCAAGC, GCGAGAGC, GCGATAGC, GCGAATGC, GCGTTAGC.

35

12. Procédé de préparation d'un oligonucléotide selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisé en ce qu'on prépare une séquence comportant ladite séquence d'intérêt à l'extrémité 3' ou aux deux extrémités 3' et 5' de laquelle on ajoute aux séquences nucléotidiques supplémentaires dont la nature et la longueur permettent un auto-appariement intra-caténaire stable de ladite séquence supplémentaire impliquant au moins ses deux bases terminales à l'extrémité 3' pour la séquence supplémentaire à l'extrémité 3' et l'extrémité 5' pour la séquence supplémentaire à l'extrémité 5', de manière à adopter la structure en semi-agrafe ou agrafe.

13. Utilisation des oligonucléotides selon l'une des revendications 1 à 11, à titre de médicament.

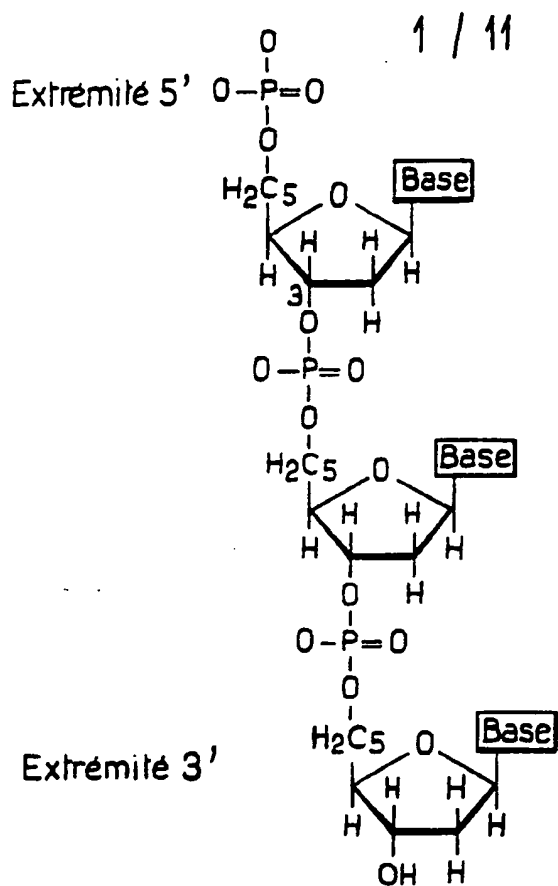
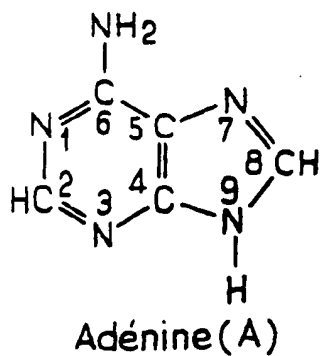
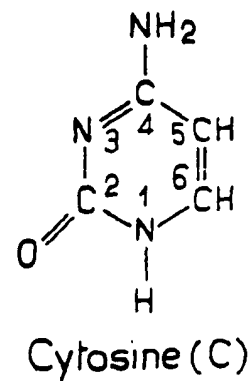
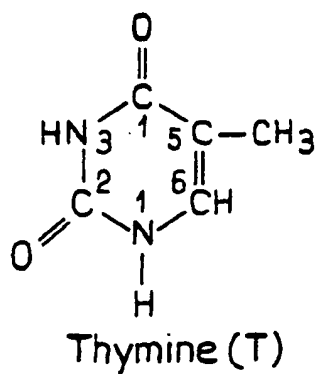
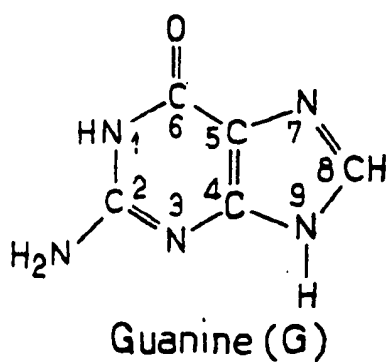
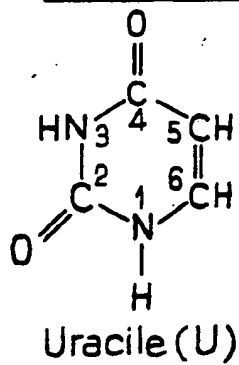
14. Composition pharmaceutique destinée à des utilisations à visée thérapeutique et, en particulier, à des indications en dermatologie et en virologie ou en cancérologie comportant, à titre de principe actif, un (ou plusieurs) oligonucléotide(s) selon l'une des revendications 1 à 11 avec des excipients pharmaceutiques appropriés.

15. Utilisation des oligonucléotides selon l'une des revendications 1 à 11 à des fins de recherche de cosmétique ou de diagnostic.

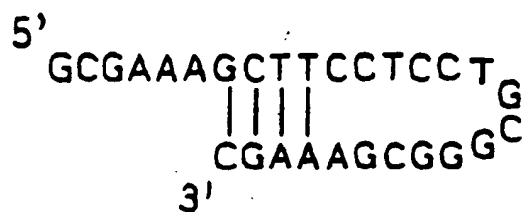
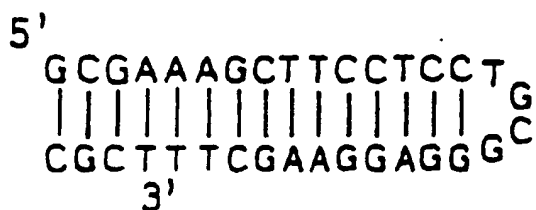
16. Composition destinée à des usages para-pharmaceutiques et, en particulier, à des usages cosmétiques comportant à titre de principe actif, un (ou plusieurs) oligonucléotide(s) selon l'une des revendications 1 à 11 avec des excipients appropriés.

17. Composition, matériel ou kit destiné(e) à être utilisé(e) à des fins de dosage d'acides nucléiques ou de diagnostic, comportant un ou plusieurs oligonucléotide(s) selon l'une des revendications 1 à 11 avec des excipients appropriés.

18. Procédé de modulation de l'expression génétique d'une séquence cible appartenant à un ARN messenger ou à un ADN, caractérisé en ce qu'on hybride ladite séquence cible avec un oligonucléotide selon l'une des revendications 1 à 11, comportant une séquence complémentaire à
- 5 ladite séquence cible.

FIG. 1PURINESPYRIMIDINES

2 / 11

FIG 2AFIG 2BFIG 2CFIG 2D

3 / 11

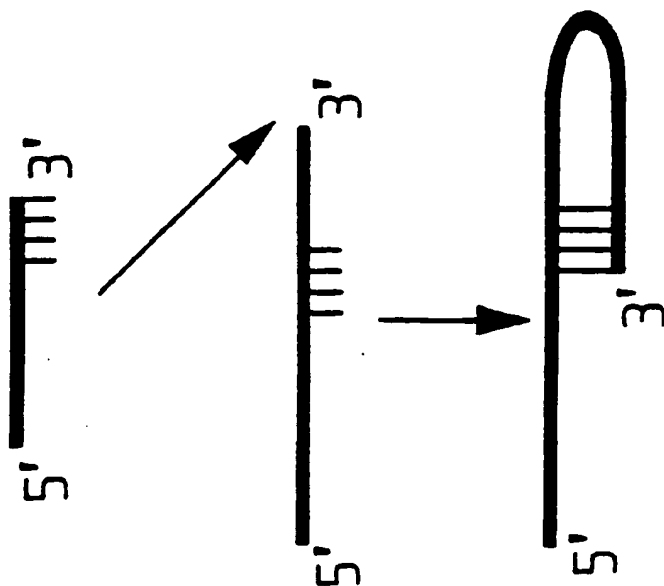


FIG. 3b

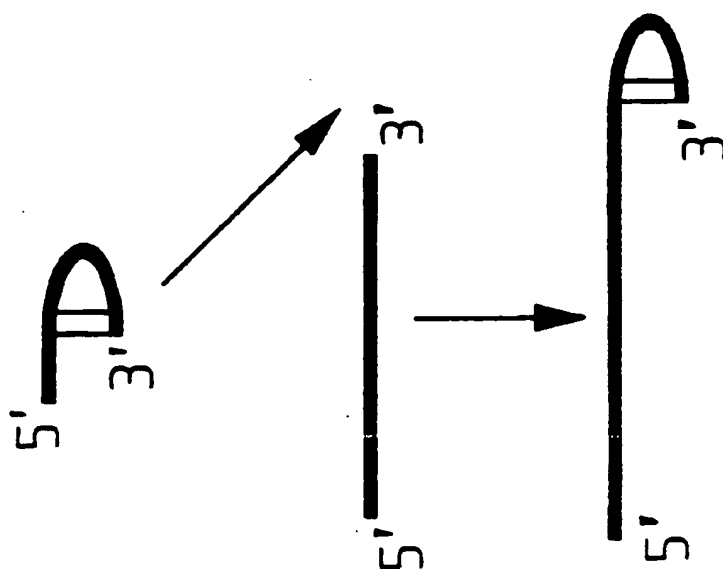


FIG. 3a

4 / 11

FIG. 4a

<u>POLYA12</u>	5' AAAAAAAAAAAAAA 3'
<u>SA12</u>	5' AAAAAAAAAAAAAA GCGA 3' CGAA
<u>HA12</u>	AAGCAAAAAAAAAAAAAA GCGA AGCG 5' 3' CGAA
<u>RA12</u>	5' AAAAAAAAAAAAAA GCTTCCTCCT G 3' CGAAAGCGGG C
<u>SA12/m1</u>	5' AAAAAAAAAAAAAA TAGAAAGC 3'
<u>HA12/m1</u>	5' CGGAAAGCAAAAAAAAAAAAAA GCGA 3' CGAA
<u>HA12/m2</u>	5' CGGAAAGCAAAAAAAAAAAAAA TAGAAAGC 3'
<u>RA12/m1</u>	5' AAAAAAAAAAAAAA CGAACCTCCTGCGGGCGA 3' CGAA

5 / 11

FIG. 4b

<u>MV10</u>	5' TTCCTCCTGCGG 3'
<u>SMV10</u>	5' TTCCTCCTGCGG GCGA 3' CGAA
<u>SMV10/m1</u>	5' TTCCTCCTGCGGTAGAAAGC 3'
<u>HMV10</u>	5' GCGAAAGCTTCCTCCT G 3' CGAAAGCGG C

FIG 5A3

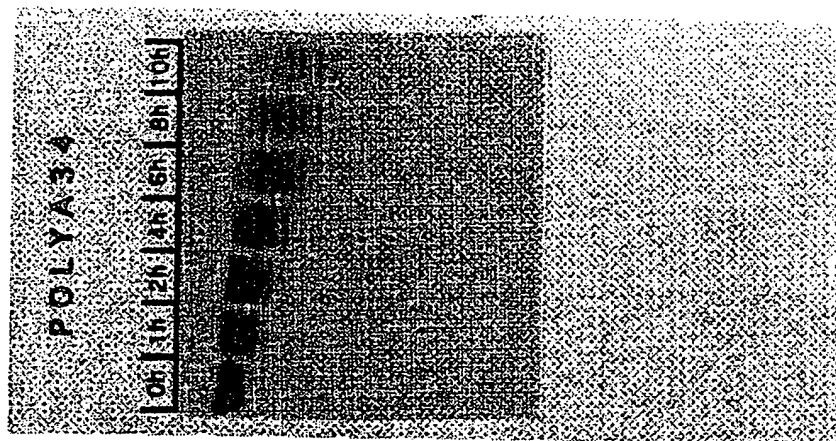


FIG 5A2

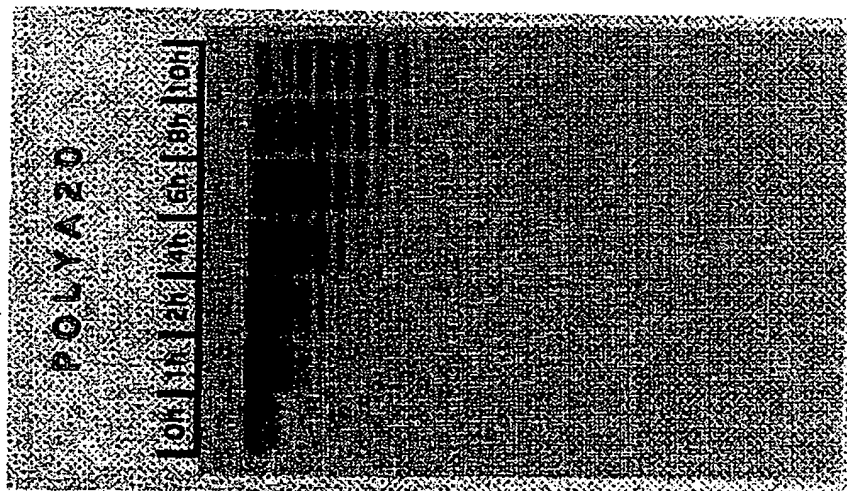
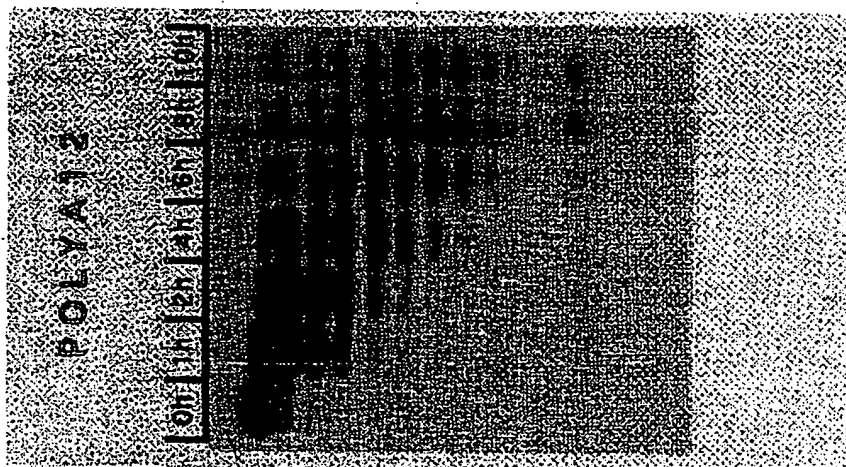


FIG 5A1



7 / 11

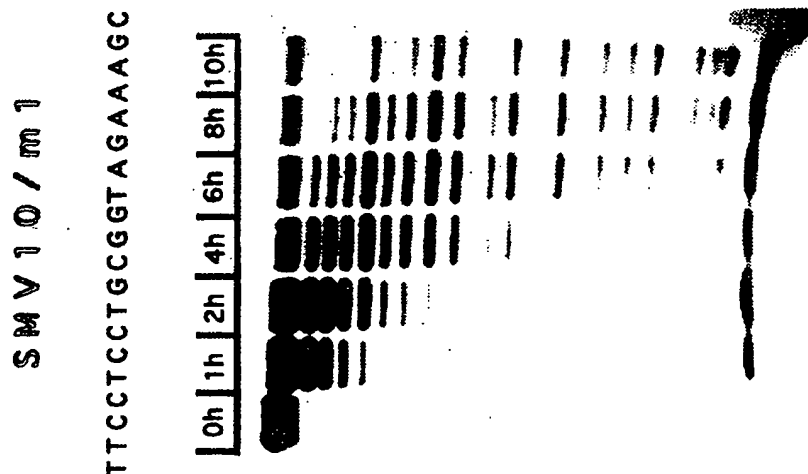


FIG 5B2

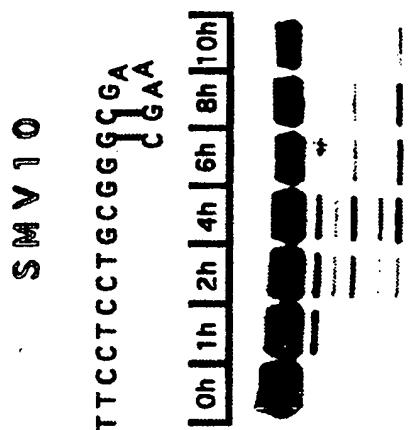


FIG 5B1

8 / 11

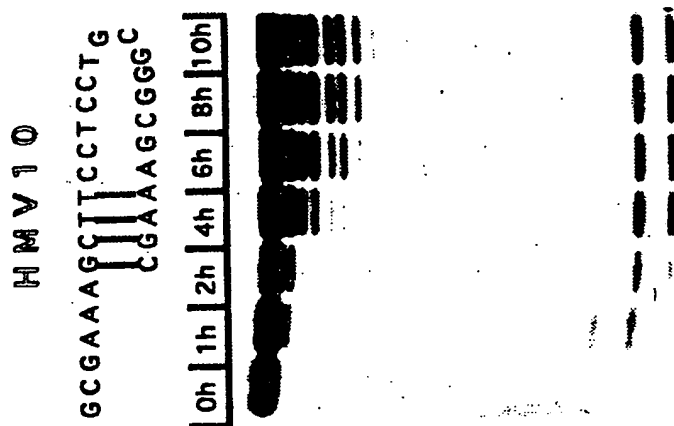


FIG. 5d

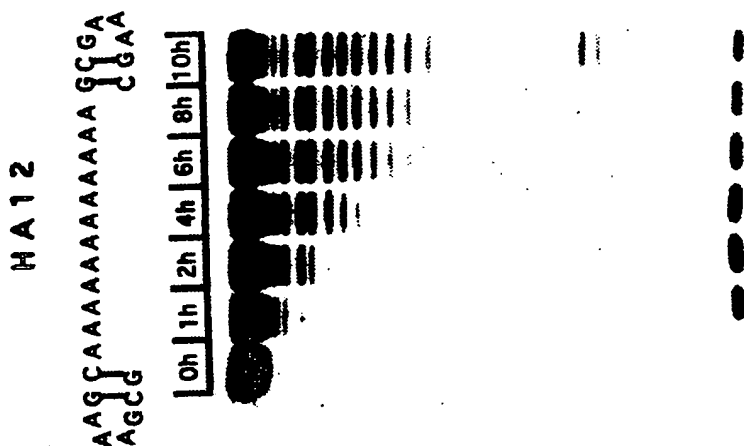


FIG. 5c

9 / 11

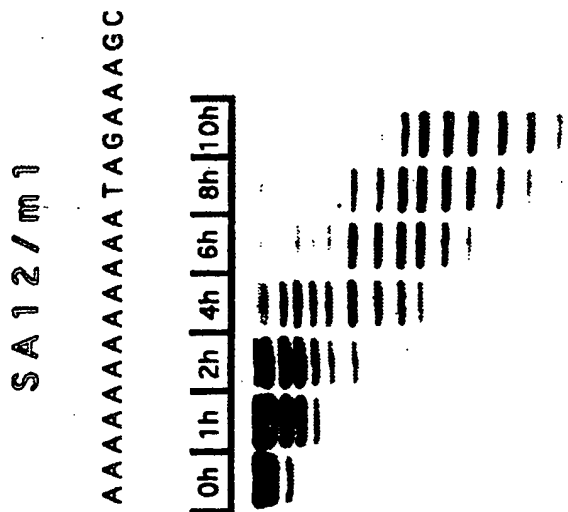


FIG 5E2

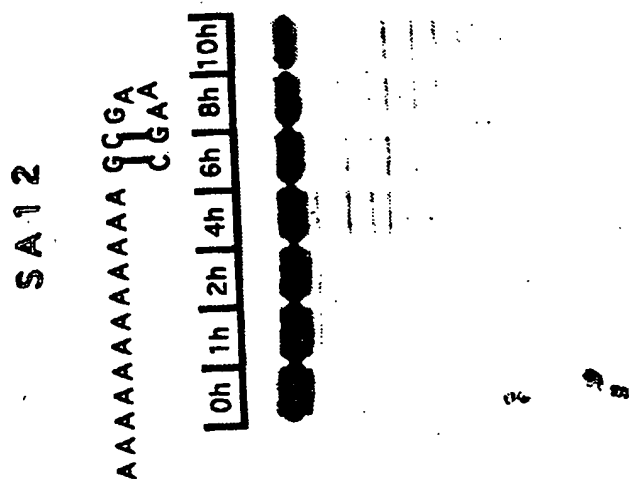


FIG. 5E1

10 / 11

OLIGO	DEMI-VIE	LONGUEUR	TYPE
POLYA12	35 min	12 mer	LINEAIRE
POLYA20	65 min	20 mer	LINEAIRE
POLYA28	60 min	20 mer	LINEAIRE
POLYA34	65 min	28 mer	LINEAIRE
SA12	4.5 h	20 mer	SEMI-AGRAFE
SA12/m1	30 min	20 mer	LINEAIRE
HA12	7.5 h	28 mer	AGRAFE
HA12/m1	7.5 h	28 mer	SEMI-AGRAFE
HA12/m2	55 min	28 mer	LINEAIRE
RA12	3.5 h	34 mer	SEMI-AGRAFE
RA12/m1	4 h	34 mer	SEMI-AGRAFE

FIG.6a

OLIGO	DEMI-VIE	LONGUEUR	TYPE
MV10	45 min	12 mer	LINEAIRE
SMV10	4 h	20 mer	SEMI-AGRAFE
SMV10/m1	30 min	20 mer	LINEAIRE
HMV10	8 h	28 mer	SEMI-AGRAFE

FIG.6b

11 / 11

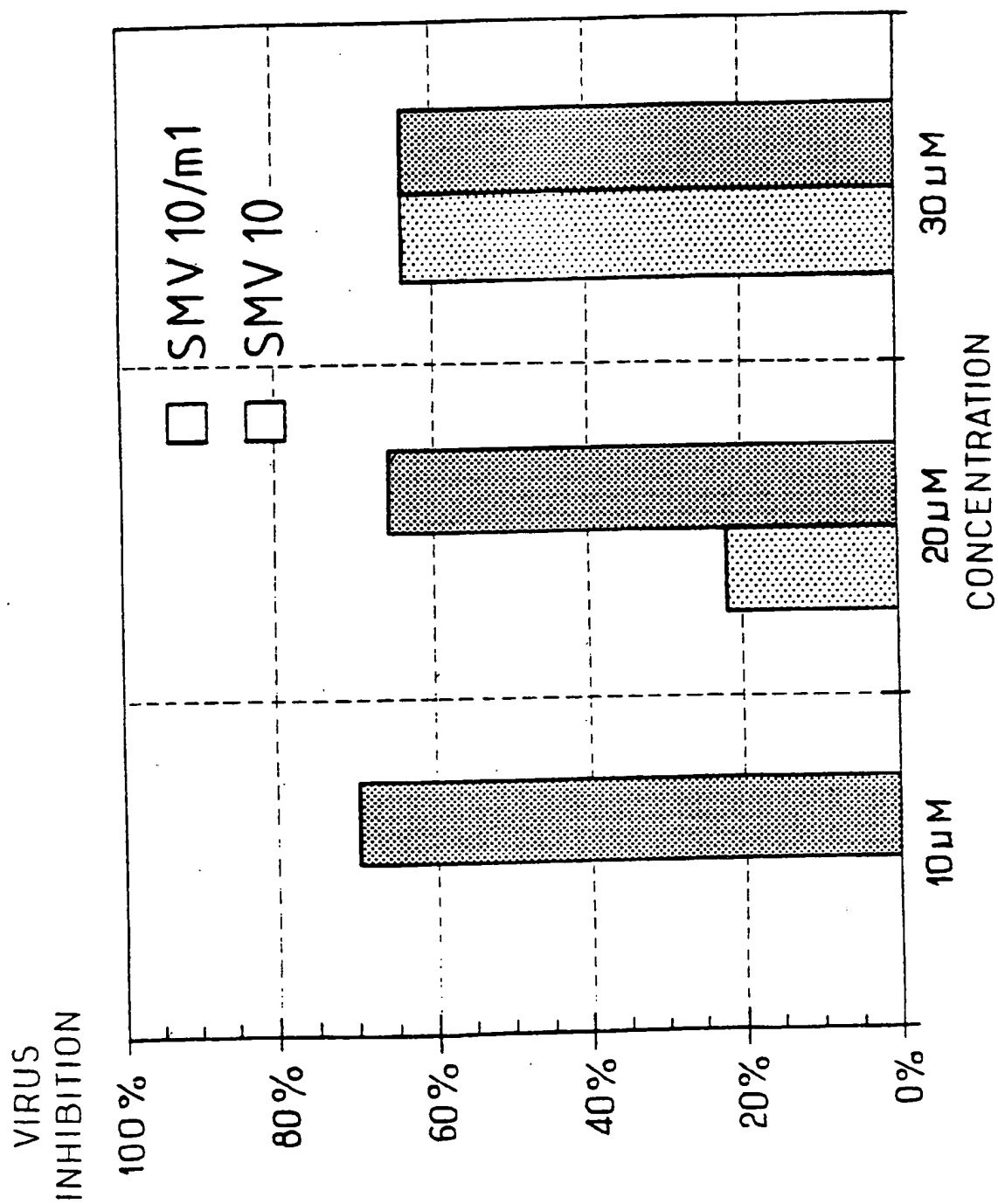


FIG. 7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 94/00336

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 5 C12N15/11 C12Q1/68 //C07H21/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 5 C12N C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO,A,91 17246 (ISIS PHARMACEUTICALS) 14 November 1991	1-5
Y	see the whole document ---	6-10
Y	WO,A,92 02641 (GENTA INC.) 20 February 1992 see the whole document ---	6-10
X	EMBO JOURNAL. vol. 8, no. 13, 1989, EYNSHAM, OXFORD GB pages 4297 - 4305 C. CASE ET AL. see the whole document --- -/--	1-5

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

18 August 1994

Date of mailing of the international search report

23-08-1994

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Molina Galan, E

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern: al Application No

PCT/FR 94/00336

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NUCLEIC ACIDS RESEARCH vol. 20, no. 24 , 1992 , ARLINGTON, VIRGINIA US pages 6723 - 6732 T. HJALT ET AL. see the whole document ---	1-5
X	NUCLEIC ACIDS RESEARCH vol. 19, no. 11 , 1991 , ARLINGTON, VIRGINIA US pages 2971 - 2977 J. JACQUES ET AL. see the whole document ---	1-5
A	EP,A,0 427 074 (MOLECULAR DIAGNOSTICS) 15 May 1991 see the whole document ---	1
A	WO,A,92 19732 (GENSET) 12 November 1992 see the whole document ---	1-18
P,X	WO,A,94 01550 (HYBRIDON INC.) 20 January 1994 see claims ---	1-5, 13-18
E	WO,A,94 12633 (STIEFEL LABORATORIES) 9 June 1994 see the whole document -----	1-5, 11-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 94/00336

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9117246	14-11-91	AU-A- 7775391 EP-A- 0529008 JP-T- 5503633	27-11-91 03-03-93 17-06-93
WO-A-9202641	20-02-92	AU-A- 8400391 CA-A- 2089088 EP-A- 0542887 JP-T- 6500322	02-03-92 10-02-92 26-05-93 13-01-94
EP-A-0427074	15-05-91	AU-B- 642922 AU-A- 6594990 JP-A- 4008292	04-11-93 16-05-91 13-01-92
WO-A-9219732	12-11-92	FR-A- 2675803 AU-A- 1759692 CA-A- 2102229 EP-A- 0581848	30-10-92 21-12-92 26-10-92 09-02-94
WO-A-9401550	20-01-94	AU-B- 4770093	31-01-94
WO-A-9412633	09-06-94	GB-A- 2273932	06-07-94

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demar internationale No

PCT/FR 94/00336

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 5 C12N15/11 C12Q1/68 //C07H21/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 5 C12N C12Q

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO,A,91 17246 (ISIS PHARMACEUTICALS) 14 Novembre 1991	1-5
Y	voir le document en entier ---	6-10
Y	WO,A,92 02641 (GENTA INC.) 20 Février 1992 voir le document en entier ---	6-10
X	EMBO JOURNAL. vol. 8, no. 13, 1989, EYNHAM, OXFORD GB pages 4297 - 4305 C. CASE ET AL. voir le document en entier --- -/-	1-5

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

18 Août 1994

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

24-08-1994

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Molina Galan, E

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demar internationale No

PCT/FR 94/00336

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	NUCLEIC ACIDS RESEARCH vol. 20, no. 24 , 1992 , ARLINGTON, VIRGINIA US pages 6723 - 6732 T. HJALT ET AL. voir le document en entier ---	1-5
X	NUCLEIC ACIDS RESEARCH vol. 19, no. 11 , 1991 , ARLINGTON, VIRGINIA US pages 2971 - 2977 J. JACQUES ET AL. voir le document en entier ---	1-5
A	EP,A,0 427 074 (MOLECULAR DIAGNOSTICS) 15 Mai 1991 voir le document en entier ---	1
A	WO,A,92 19732 (GENSET) 12 Novembre 1992 voir le document en entier ---	1-18
P,X	WO,A,94 01550 (HYBRIDON INC.) 20 Janvier 1994 voir revendications ---	1-5, 13-18
E	WO,A,94 12633 (STIEFEL LABORATORIES) 9 Juin 1994 voir le document en entier -----	1-5, 11-18

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande Internationale No

PCT/FR 94/00336

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO-A-9117246	14-11-91	AU-A- 7775391	27-11-91
		EP-A- 0529008	03-03-93
		JP-T- 5503633	17-06-93

WO-A-9202641	20-02-92	AU-A- 8400391	02-03-92
		CA-A- 2089088	10-02-92
		EP-A- 0542887	26-05-93
		JP-T- 6500322	13-01-94

EP-A-0427074	15-05-91	AU-B- 642922	04-11-93
		AU-A- 6594990	16-05-91
		JP-A- 4008292	13-01-92

WO-A-9219732	12-11-92	FR-A- 2675803	30-10-92
		AU-A- 1759692	21-12-92
		CA-A- 2102229	26-10-92
		EP-A- 0581848	09-02-94

WO-A-9401550	20-01-94	AU-B- 4770093	31-01-94

WO-A-9412633	09-06-94	GB-A- 2273932	06-07-94

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.